

REGINA RODRIGUES CALIXTO

Estratégias de uso de nitrogênio em excesso no solo por espécies da Floresta Atlântica sob a influência de alta temperatura

Dissertação apresentada ao Instituto de Botânica da Secretaria de Infraestrutura e 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

2022

REGINA RODRIGUES CALIXTO

Estratégias de uso de nitrogênio em excesso no solo por espécies da Floresta Atlântica sob a influência de alta temperatura

Dissertação apresentada ao Instituto de Botânica da Secretaria de Infraestrutura e 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.

ORIENTADORA: DRA. MARISA DOMINGOS

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito.

Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

Martin Luther King

*“Entre as imagens que mais profundamente marcaram minha mente, nenhuma excede a
grandeza das florestas primitivas, poupadas da mutilação pela mão do homem. Ninguém
pode passar por essas solidões intocado, sem sentir que existe mais dentro do homem do
que a mera respiração do seu corpo”.*

Charles Darwin

Ficha Catalográfica elaborada pelo **NÚCLEO DE BIBLIOTECAS E MAPOTECAS**

Calixto, Regina Rodrigues
C153e Estratégias de uso de nitrogênio em excesso no solo por espécies da Floresta Atlântica sob a influência de alta temperatura /Regina Rodrigues Calixto – São Paulo, 2022. 69p.; il.
 Dissertação (Mestrado) -- Instituto de Pesquisas Ambientais da Secretaria de Infraestrutura e Meio Ambiente, 2022. Bibliografia.
 1. Alta temperatura. 2. Deposição de nitrogênio. 3. Metabolismo de nitrogênio. I. Título
 CDU: 581.526.422.2

Aos meus pais Norma e Geraldo

(In memoriam)

Dedico

Agradecimentos

Agradeço imensamente todos que me auxiliaram para chegar até aqui

Ao Instituto de Pesquisas Ambientais (IPA) pela infraestrutura concedida.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à Pesquisa (FAPESP; processo Fapesp 2019/19058-5) pelas bolsas concedidas. À FAPESP pelo suporte financeiro (PDIP/IBt: Desafios para conservação da biodiversidade frente a mudanças climáticas, poluição e uso e ocupação do solo; processo nº 2017/50341-0).

À minha super orientadora Dra. Marisa Domingos, quem conhece sabe que ela é super mesmo! Sua paciência e gentileza para me ensinar foram diferenciais para o meu crescimento. A confiança que depositou em mim para realizar este trabalho foi sem dúvidas uma das coisas que me motivaram nos momentos mais desafiadores durante o mestrado e a pandemia. Nos momentos difíceis eu pensava: - Se ela acredita em mim para fazer isso, então eu posso sim fazer qualquer coisa!

À Dra. Mirian Spasiani Rinaldi que sempre me auxiliou com tanta paciência, e tanta dedicação, não importava a dúvida que fosse ela sempre está ali para acolher!

À Dra. Marisia Pannia Esposito a minha primeira orientadora! Me orientou em duas iniciações científicas que nunca vou esquecer, abriu as portas do mundo acadêmico para mim, e sempre me ensinando com tanta dedicação, sempre me passando muita força, é sem dúvida uma das pessoas por quem tenho muita admiração. E além de tudo isso é minha amiga! Sou abençoada por ter sua amizade! Mariiiiiiiii!!!!

À minha melhor amiguinha Geane Martins Barbosa, irmã, parceira, confidente, sempre estivemos nos apoiando em tudo, fizemos esse mestrado juntas, e sempre nesse clima de amizade e companheirismo. Enfrentamos muitas batalhas por causa da pandemia e nunca desistimos de nada, ela sempre me fortaleceu e me acolheu nos momentos mais difíceis, principalmente nas perdas que sofri durante a pandemia, sem ela nesse período não sei se chegaria assim tão bem como estou hoje.

A Dra. Catarina Nievola e Gabriela Cabral pelo treinamento do método para análise da enzima assimiladora de nitrogênio Glutamina sintetase.

Aos alunos e ex alunos da Ecologia Ricardo, Douglas, Milton, Matheus e Geovana que ajudaram durante o experimento que não foi fácil, sou grata aos momentos de descontração, e toda a ajuda que me deram nesse período.

Aos meus Pais Norma e Geraldo que infelizmente não estão mais presentes para me ver completar essa fase, perdi durante a pandemia e mestrado, e essa sem dúvidas foi a parte mais difícil durante esse período, mas saibam que não desisti, e consegui honrar a memória de vocês.

Ao meu companheiro Fernando G. Lima, que sempre me incentivou e me ajudou em tudo, e nas fases difíceis se fez presente me apoiando e me fortalecendo.

Sumário

LISTA DE FIGURAS.....	8
LISTA DE TABELAS.....	9
RESUMO.....	10
ABSTRACT	12
1. INTRODUÇÃO	13
1.1Ciclo do nitrogênio e seu aproveitamento pelas espécies	13
1.2 Deposição atmosférica de nitrogênio e seus efeitos nos ecossistemas.....	17
1.3 Efeitos combinados do aquecimento global e deposição atmosférica de nitrogênio sobre os ecossistemas	19
1.4 Efeitos do aquecimento global e deposição atmosférica de nitrogênio sobre espécies nativa da Floresta Atlântica.....	20
2. HIPÓTESES.....	24
3. OBJETIVOS.....	25
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	26
4.1. Escolha das espécies e plantio de mudas.....	26
4.2. Delineamento experimental.....	26
4.3. Técnicas analíticas.....	30
4.3.1. Concentrações de amônio e nitrato em solo e plantas.....	30
4.3.2. Atividade das enzimas assimiladoras de N em folhas e raízes.....	31
4.3.3. Concentrações de pigmentos em folhas.....	32
4.3.4. Medidas de crescimento.....	33
4.4. Estatística.....	33
5. RESULTADOS.....	34
5.1. Concentrações de N-NH_4^+ e N-NO_3^- no solo.....	34
5.2. Concentrações de NH_4^+ e NO_3^- em folhas e raízes.....	37
5.3. Atividade das enzimas nitrato redutase e glutamina sintetase em folhas e raízes.....	42
5.4. Concentrações de pigmentos em folhas.....	46
5.5. Curvas de crescimento.....	46
6. DISCUSSÃO.....	52
7. CONCLUSÕES.....	57
8. BIBLIOGRAFIA.....	60

LISTA DE FIGURAS

Figura.1: Representação de algumas das fases do ciclo do N	14
Figura.2: Representação da troca catiônica na superfície da partícula do solo	15
Figura.3: Transporte de íons (nutrientes) via simplasto e apoplasto	15
Figura.4: Câmaras climatizadas situadas no Instituto de Pesquisas Ambientais.....	29
Figura.5 Representação gráfica NH_4^+ e NO_3^- no solo.....	35
Figura.6: Representação gráfica NH_4^+ endógeno em folhas e raízes	39
Figura. 7: Representação gráfica NO_3^- endógeno em folhas e raízes.....	41
Figura.8: Representação gráfica da enzima assimiladora de N: Nitrato Redutase.....	43
Figura.9: Representação gráfica da enzima assimiladora de N: Glutamina sintetase.....	45
Figura.10: Representação gráfica de Pigmentos: Clorofila a, b, total e carotenoides.....	48
Figura.11: Representação gráfica das curvas de crescimento.....	51

LISTA DE TABELAS

Tabela.1: Solução nutritiva balanceada para o grupo de plantas.....	28
Tabela.2: Valores médios das concentrações de N-NH ₄ e N-NO ₃ no solo (mg/kg) ao longo de 28 dias de experimento realizado com <i>Croton floribundus</i> e <i>Esenbeckia leiocarpa</i> e valores de p resultantes da ANOVA fatorial.....	36
Tabela 3: Valores médios da razão NH ₄ ⁺ / NO ₃ ⁻ no solo ao longo de 28 dias de experimento realizado com <i>Croton floribundus</i> e <i>Esenbeckia leiocarpa</i> e valores de p resultantes da ANOVA fatorial	37
Tabela 4: Valores médios das concentrações de N-NH ₄ (µg NH ₄ ⁺ /g MS) em folhas e raízes de <i>Croton floribundus</i> e <i>Esenbeckia leiocarpa</i>	39
Tabela 5: Valores médios das concentrações de N-NO ₃ ⁻ (µg NO ₃ ⁻ /g MS) em folhas e raízes de <i>Croton floribundus</i> e <i>Esenbeckia leiocarpa</i> ao longo de 28 dias de experimento e valores de p resultantes da ANOVA fatorial	41
Tabela 6: Valores médios da atividade da enzima nitrato redutase (µmol NO ₂ ⁻ /h/g MS) em folhas e raízes de <i>Croton floribundus</i> e <i>Esenbeckia leiocarpa</i> ao longo de 28 dias de experimento e valores de p resultantes da ANOVA fatorial	44
Tabela 7: Valores médios da atividade da enzima glutamina sintetase (GS) (µmol GGH/h/gMS) em folhas e raízes de <i>Croton floribundus</i> e <i>Esenbeckia leiocarpa</i> ao longo de 28 dias de experimento e valores de p resultantes da ANOVA fatorial.....	46
Tabela 8: Valores médios da concentração de clorofila total em folhas de <i>Croton floribundus</i> e <i>Esenbeckia leiocarpa</i> ao longo de 28 dias de experimento e valores de p resultantes da ANOVA fatorial.....	47
Tabela 9: Valores médios da concentração de clorofila <i>a</i> em folhas de <i>Croton floribundus</i> e <i>Esenbeckia leiocarpa</i> ao longo de 28 dias de experimento e valores de p resultantes da ANOVA fatorial.....	49
Tabela 10: Valores médios da concentração de clorofila <i>b</i> em folhas de <i>Croton floribundus</i> e <i>Esenbeckia leiocarpa</i> ao longo de 28 dias de experimento e valores de p resultantes da ANOVA fatorial.....	49
Tabela 11: Valores médios da concentração de carotenoides em folhas de <i>Croton floribundus</i> e <i>Esenbeckia leiocarpa</i> ao longo de 28 dias de experimento e valores de p resultantes da ANOVA fatorial.....	50

RESUMO

Apesar da deposição antrópica de compostos solúveis de N e o aquecimento da atmosfera já terem sido comprovados no entorno de remanescentes urbanos de Floresta Atlântica em São Paulo, pouco se conhece sobre os efeitos desses distúrbios ambientais sobre os processos biogeoquímicos no solo e sobre o metabolismo de N nas espécies presentes nesses remanescentes florestais. Sendo assim, o presente estudo foi proposto com os objetivos de: 1) verificar se há aumento da biodisponibilidade de NH_4^+ e NO_3^- no solo e das concentrações de N solúvel nas raízes e folhas de plantas jovens de uma espécie arbórea pioneira e uma espécie arbórea não pioneira, quando cultivadas em vasos contendo solo superficial proveniente de um fragmento urbano de Floresta Atlântica, após adição de nitrogênio; 2) verificar se o nível de atividade de nitrato redutase e glutamina sintetase, as concentrações de pigmentos em folhas e o crescimento diferem entre as referidas espécies; 3) verificar se as proporções entre NH_4^+ e NO_3^- no solo e se as estratégias de aproveitamento dessas formas solúveis de N pelas duas espécies são alteradas pela elevação da temperatura do ar. Foram realizados dois experimentos independentes (um para cada espécie) em uma câmara de crescimento, subdividida em dois ambientes autônomos, denominados câmara 1 e câmara 2. Na câmara 1, as plantas foram mantidas em termoperíodo de 26°C dia/19°C noite e na câmara 2, em termoperíodo de 32°C dia/20°C noite. Cada experimento foi iniciado com 96 plantas por câmara, sendo 48 plantas cultivadas em solo de floresta urbana com tratamento de fertilização balanceada e 48 plantas cultivadas no mesmo solo com fertilização balanceada + N, compondo-se 4 réplicas inteiramente casualizadas por tratamento, com 12 plantas cada. Foram retiradas 3 plantas por réplica de tratamento aos 7, 14, 21 e 28 dias de experimento. Raízes e folhas destas foram reunidas de modo a obter 4 amostras mistas de ambos os órgãos por tratamento a cada 7 dias. As amostras mistas de raízes e folhas foram analisadas quanto à atividade das enzimas nitrato redutase (NR) e glutamina sintetase (GS) e concentrações de N- NH_4 e N- NO_3 , clorofila as a e b e carotenoides. Foram realizadas medidas de altura e número de folhas e determinada a biomassa seca de folhas e raízes a cada 7 dias. O solo utilizado para crescimento das 3 plantas por réplica de tratamento foi retirado aos 7, 14, 21 e 28 dias de experimento e também foi reunido para compor 4 amostras mistas por tratamento e por semana para análise das concentrações de NH_4^+ e NO_3^- . Os dados foram submetidos a análise de variância com três fatores (Fator 1: temperatura; fator 2: tratamento de solo; fator 3: tempo). Em um cenário de mudanças climáticas e alta

deposição de nitrogênio, há indícios de que a espécie *E. leiocarpa* seja mais suscetível a esses efeitos, visto que apresentou redução no número de folhas e aumento de pigmentos característicos do estresse oxidativo. E a pioneira *C. floribundus* demonstrou estratégias eficientes no uso do N e tolerância ao estresse climático, podendo ser indicada para trabalhos de restauração.

ABSTRACT

Despite the anthropogenic deposition of soluble N compounds and the warming of the atmosphere have already been confirmed in the surroundings of urban remnants of Atlantic Forest in São Paulo, little is known about the effects of these environmental disturbances on biogeochemical processes in the soil and on the metabolism of N in the species present in these forest remnants. Therefore, the present study was proposed with the aims of verifying whether: 1) there is an increase in the bioavailability of NH_4^+ and NO_3^- in the soil and in the concentrations of soluble N in the roots and leaves of young plants of a pioneer tree species and a non-pioneer tree species, when grown in pots containing topsoil from an urban fragment of Atlantic Forest, after nitrogen addition; 2) the level of activity of nitrate reductase and glutamine synthetase, the concentrations of pigments in leaves and growth differ between those species; 3) the proportions between NH_4^+ and NO_3^- in the soil and the strategies of use of these soluble forms of N by the three species are altered by the increase of the air temperature. Two independent experiments were carried out (one for each species) in a growth chamber, subdivided into two autonomous environments, called chamber 1 and chamber 2. In chamber 1, the plants were kept in a thermoperiod of 26°C day/19°C night and in chamber 2, in a thermoperiod of 32°C day/20°C night. Each experiment started with 96 plants per chamber, 48 plants grown in urban forest soil without N addition and 48 plants grown in the same soil with N addition, composing 4 completely randomized replicates per treatment, with 12 plants each. Three plants were removed per treatment replicate at 7, 14, 21 and 28 days of experiment. Roots and leaves of them were pooled to obtain 4 mixed samples from both organs per treatment every 7 days. The mixed root and leaf samples were analyzed for the activity of the enzymes nitrate reductase (NR) and glutamine synthetase (GS) and concentrations of NH_4 and NO_3 , chlorophylls a and b and carotenoids. Measurements of

height and number of leaves were measured, and dry biomass of leaves and roots was determined every 7 days. The soil used for the growth of the 3 seedlings per treatment replicate were removed at 7, 14, 21 and 28 days of experiment. It was also pooled to compose 4 mixed samples per treatment and per week for analysis of NH_4^+ and NO_3^- concentrations. The data were submitted to analysis of variance with three factors (Factor 1: temperature; factor 2: soil treatment; factor 3: time). In a scenario of climate change and high disease deposition, there are indications that the species *E. leiocarpa* is more susceptible to these effects, given that it showed a reduction in the number of leaves and an increase in pigments characteristic of oxidative stress. And the pioneer *C. floribundus* demonstrated efficient strategies in the use of N and tolerance to climatic stress, which may be indicated for restoration work.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Ciclo de nitrogênio e seu aproveitamento pelas plantas

O nitrogênio (N) é um nutriente requerido pelas plantas para a síntese de inúmeros metabólitos essenciais ao seu crescimento, como aminoácidos, proteínas, clorofilas e ácidos nucleicos, sendo, portanto, a base de sustentação das cadeias alimentares nos ecossistemas naturais (Liu et al., 2018; Ruan et al., 2019).

No entanto, mais de 99,5% do N global está armazenado na atmosfera e em rochas sedimentares, em formas não aproveitáveis pelos seres vivos (Cheng et al., 2019). A ligação tripla covalente entre os dois átomos de nitrogênio molecular (N_2) armazenado na atmosfera deve ser quebrada para produzir compostos passíveis de serem absorvidos pelas plantas, processo denominado fixação de N (Van den Berg & Ashmore 2008). Este ocorre basicamente de três formas distintas: 1) pela ação de relâmpagos, que convertem o vapor de água e oxigênio em radicais hidroxila livres altamente reativos, em átomos de hidrogênio livre e em átomos de oxigênio livre, que reagem com o N_2 para formar o ácido nítrico (HNO_3), que precipita sobre a terra junto com a chuva; 2) por reações fotoquímicas entre o óxido nítrico gasoso (NO) e o ozônio (O_3), produzindo também o ácido nítrico (HNO_3); 3) por ação de bactérias nitrificantes presentes no solo, que fixam o N_2 em amônio (NH_4^+) e este é oxidado a nitrato (NO_3^-) por processos denominados amonificação e nitrificação, respectivamente (Fig. 1). As plantas são a principal rota de transferência de nutrientes do meio geofísico para o meio biológico. A fixação biológica é responsável por cerca de 90% da transformação do N_2 em formas aproveitáveis pelos seres vivos (Taiz & Zeiger 2004; Cheng et al., 2019).

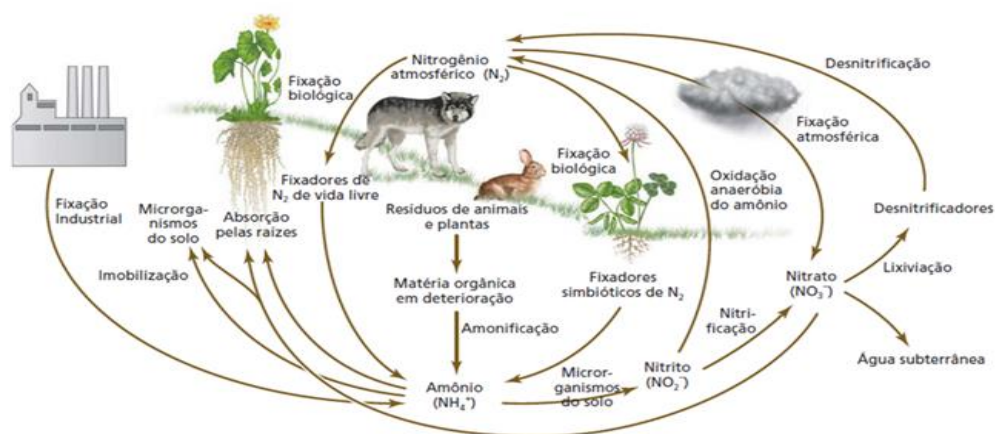


Figura.1: Representação de algumas das fases do ciclo do N, da atmosfera à sua transformação em íons reduzidos solúveis, antes de ser incorporado a compostos orgânicos nos organismos vivos. (Taiz & Zeiger, 2004)

O solo representa um sistema biologicamente complexo na natureza, sendo constituído de fases sólidas, líquidas e gasosas. A fase sólida se destaca como reservatório de minerais e compostos orgânicos com nitrogênio em sua composição, entre outros nutrientes. Na fase líquida, que é a solução do solo localizada em poros entre partículas e está em contato com as superfícies das raízes, contém íons minerais disponíveis para as plantas. Na fase gasosa, que ocorre nos espaços de ar entre as partículas do solo, há íons dissolvidos, onde é feita as trocas gasosas com o solo (Liu et al, 2020).

As partículas do solo, tanto orgânicas quanto inorgânicas, possuem cargas majoritariamente negativas em sua superfície, podendo afetar a dinâmica da adsorção de nutrientes. Cátions minerais como amônio (NH_4^+) e potássio (K^+) são facilmente adsorvidos às cargas negativas, fazendo com que estes nutrientes não sejam lixiviados quando o solo é infiltrado por água. Ânions minerais como o nitrato (NO_3^-) tendem a ser repelidos pela carga negativa nas partículas do solo e ficam dissolvidos na solução do solo. A troca aniônica na maioria dos solos é menor se comparada com a troca catiônica (Fig. 2). Portanto, a perda de nitrato (NO_3^-) do solo por lixiviação pela água tende a ser maior devido a este permanecer móvel na solução solo. Por outro lado, ao ser mantido

móvel na solução do solo, o nitrato (NO_3^-) é absorvido pelas raízes por fluxo de massa (Zhan et al 2015; Liu et al, 2020).

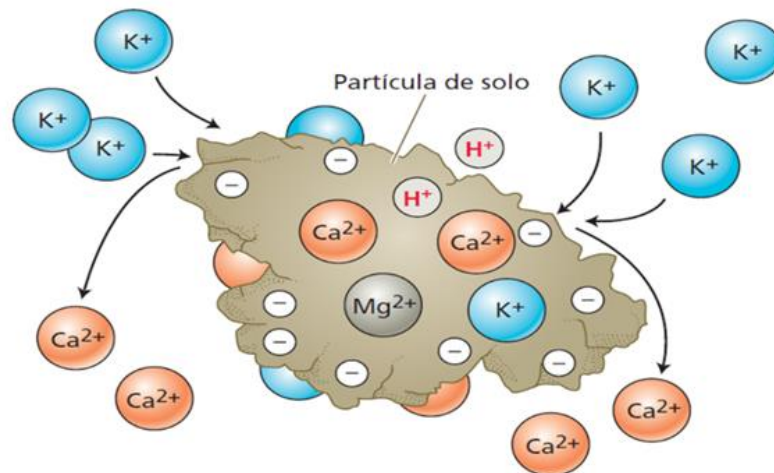


Figura.2: Representação da troca catiônica na superfície da partícula do solo, onde cátions são adsorvidos sobre a partícula do solo por esta superfície ser carregada negativamente (Taiz & Zeiger. 2004).

Devido a essa intensa interação entre o solo e os compostos adsorvidos em suas partículas o transporte de íons (nutrientes) para as raízes pode ocorrer de três formas distintas: 1) por difusão, de uma região de maior concentração para uma de menor concentração próxima da raiz, 2) por fluxo de massa, que carrega o íon de um local de maior potencial hídrico para um com menor potencial hídrico próximo da raiz 3) por interceptação radicular, a raiz cresce e encontra o nutriente (Fig. 3).

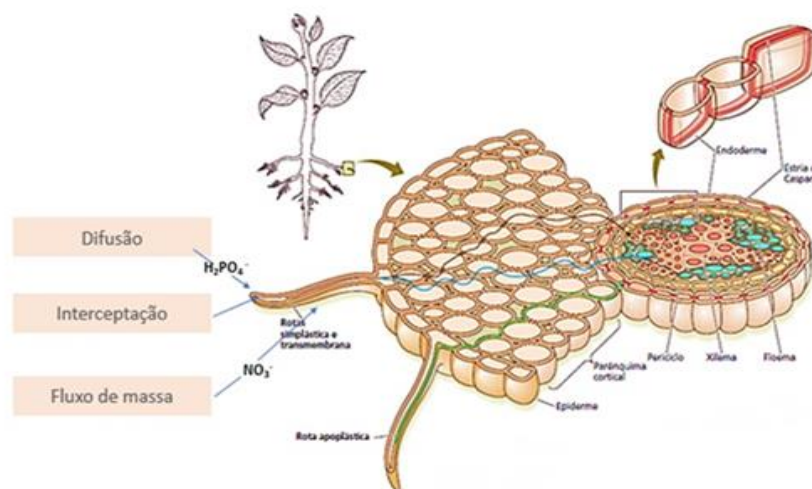


Figura.3: Transporte de íons nutrientes pelas raízes via simplasto e apoplasto (Taiz & Zeiger. 2004).

As plantas assimilam predominantemente N do solo nas formas de NO_3^- e NH_4^+ (Debiasi et al. 2021). O processo de entrada desses íons pela membrana plasmática das células da epiderme e do córtex da raiz se dá por meio de transportadores de alta afinidade (HATS) e baixa afinidade (LATS), que estão presentes em todas as plantas. A concentração externa de N na forma iônica determina qual transportador atuará na absorção e transporte do íon. Para NO_3^- , sob concentrações externas inferiores a $100\text{-}200\mu\text{mol l}^{-1}$, o transporte pela membrana ocorre via transportadores de alta afinidade (HATS), com K_m entre 7 e $100\mu\text{mol l}^{-1}$. Acima destas concentrações, a absorção de NO_3^- ocorre pelos transportadores de baixa afinidade (LATS), com K_m maior que $0,5\text{ mmol l}^{-1}$. Para NH_4^+ , a absorção é intermediada pelo HATS quando a concentração externa deste íon é menor que 1 mmol l^{-1} , enquanto o LATS absorve NH_4^+ em concentrações externas superiores a 1 mmol l^{-1} (Sinha et al., 2020; Mubasher et al. 2020). Em síntese, a absorção e transporte de nitrogênio no interior das plantas, são modulados pela presença dos transportadores específicos, pela afinidade desses transportadores em relação ao NO_3^- e NH_4^+ e pela quantidade de N presente no solo (Bredemeier et al. 2000; Mubasher et al. 2020).

De acordo com He et al. (2022), baseados em vários estudos, culturas agrícolas que preferem NH_4^+ , como arroz, chá ou cana-de-açúcar, podem também exsudar para o solo inibidores de nitrificação biológica, que resultam na retenção de N na forma de NH_4^+ e no aumento da razão $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ no solo. Esses autores, por sua vez, demonstraram que o trigo, cultura com preferência por NO_3^- , é capaz de diminuir ativamente a razão $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ no solo. No entanto, pouco se conhece a respeito para espécies arbóreas florestais.

Então, após a absorção mediada pelo transportador específico, o NO_3^- é reduzido a NH_4^+ pela ação das enzimas nitrato redutase (NR) e nitrito redutase (NRi), processos que demandam recursos e gasto de energia, em quantidade que varia de acordo com o íon

(NO_3^- ou NH_4^+) absorvido e a parte da planta em que este se encontra. Quando o íon é transportado para as folhas, onde irá ocorrer a assimilação, a energia necessária será gerada nos cloroplastos pela fotossíntese, no citosol pela glicólise e nas mitocôndrias pelo ciclo ácido tricarboxílico no processo de respiração. Quando o N absorvido se encontra nas raízes, a energia é obtida no citosol, utilizando o ciclo das pentoses e da glicólise, e nas mitocôndrias pelo ciclo do ácido tricarboxílico (Crawford et al., 1995, 2007; Sinha et al., 2020). Nos cloroplastos, as reações catalisadas pela enzima nitrito redutase (NRi) e sintase do glutamato (GOGAT) exigem a redução da ferredoxina, que é feita pelo sistema de transporte não-cíclico de elétrons. O NH_4^+ é transferido a compostos carbonados para produzir aminoácidos, entre outros compostos orgânicos nitrogenados, processos que requerem gasto de energia gerada na fotossíntese. O NH_4^+ é incorporado em aminoácidos pelas enzimas glutamina sintetase (GS), glutamato sintase (GOGAT) e glutamato desidrogenase (GDH), formando glutamina, glutamato e outros aminoácidos. Alternativamente o NO_3^- e o NH_4^+ podem ser transportados pelos carregadores específicos (HATS ou LATS) através do tonoplasto e armazenados no vacúolo, para posteriormente serem reduzidos no citosol da mesma célula ou serem translocados inalterados para a parte aérea da planta (Crawford 1995, 2007; Sinha et al 2020).

1.2. Deposição atmosférica de nitrogênio e seus efeitos nos ecossistemas

As atividades humanas têm contribuído para o aumento da fixação de N em ecossistemas florestais, suplantando a de origem natural, o que pode resultar tanto em alterações do ciclo de nitrogênio nos ecossistemas (Van den Berg & Ashmore 2008; Huang et al., 2012; Johnson & Turner, 2014; Gaudio et al., 2015; Cheng et al., 2019, Payne et al., 2019; Pornon et al., 2019; Rizzetto et al., 2019), como em mudanças no metabolismo de N nas plantas. A alta deposição antrópica N nos ecossistemas pode causar acúmulo em excesso de NH_4^+ nos tecidos vegetais, capaz de induzir estresse oxidativo, levando à

severa redução na capacidade fotossintética, deficiência de cátions, cloroses, ruptura de membranas, com serias consequências à manutenção do crescimento. Outros efeitos negativos em espécies vegetais incluem redução de raízes finas, declínio nas associações micorrízicas e forte redução na germinação e estabelecimento de plântulas (Van den Berg & Ashmore 2008; Huang et al., 2012; Johnson & Turner 2014). Em resposta à pandemia de COVID-19 em 2020, quando as atividades humanas foram pausadas, a qualidade do ar em grandes cidades de vários países melhorou significativamente, reforçando que as atividades humanas são responsáveis pela poluição do ar nas grandes cidades. Um dos sinais de saturação por influxo excessivo de N é o aumento da lixiviação deste elemento, levando a efeitos significativos nas bacias hidrográficas, que se estendem nos ecossistemas próximos, causando a eutrofização e acidificação, prejudicando a subsistência das pessoas que vivem nestes locais. (Itoh et al. 2021).

A deposição atmosférica de N total é considerada um mecanismo eficaz de remoção de gases como óxidos nitrogênio (NO_x) e formas solúveis em água como NH_4^+ e NO_3^- para a superfície terrestre. Essa deposição compreende duas formas, a seca e a úmida. A deposição seca envolve todos os processos de transferências de partículas e gases para todas as superfícies (plantas, solos, rochas, água e materiais). A deposição úmida ocorre pela remoção de partículas e gases da atmosfera através da chuva, neblina ou neve (Rodrigues et al., 2007; Boccuzzi et al., 2020; Hata et al., 2022).

Ainda que a legislação ambiental de muitos países tenha empenhado esforços para reduzir, e de fato tenha notado o declínio na deposição de N, até o presente momento a alta deposição deste elemento continua sendo motivo de preocupação em muitas regiões do mundo, em destaque para as grandes metrópoles próximas a remanescentes de florestas. Em áreas onde a deposição N é crônica, tendo como resultado a saturação, têm sido verificados diversos efeitos negativos na estrutura e a função dos ecossistemas,

incluindo perda da biodiversidade, alteração dos ciclos biogeoquímicos que por sua vez ameaçam a sustentabilidade de florestas afetadas pelo problema, produzindo desta forma o efeito cascata (Gilliam 2021). Esse autor aponta ainda que, em algumas florestas dos Alpes Australianos, mais de 80% da deposição de N foi retida no ecossistema, mantendo baixa perda hidrológica de N e promovendo o crescimento das árvores. Ainda segundo esse autor, a dinâmica da floresta frequentemente mitiga os efeitos da alta deposição de N, incluindo as trocas catiônicas do solo.

Além disso, a alta deposição antrópica de N tem proporcionado acidificação e alterações na dinâmica microbiana do solo, que podem resultar em mudanças nos processos biogeoquímicos e desequilíbrio entre absorção, assimilação e alocação do N no interior das plantas. Efeitos em longo prazo na estrutura e função dos ecossistemas são igualmente esperados (Liu et al., 2018; Shi et al., 2018).

1.3. Efeitos combinados do aquecimento global e deposição atmosférica de nitrogênio sobre os ecossistemas

O aquecimento da atmosfera, entre outros extremos climáticos observados em áreas ocupadas por populações humanas, pode ocasionar o aumento do nível foliar de NH_4^+ (Nascimento 2019). Assim, a assimilação desse íon via glutamina sintetase/glutamato sintase/glutamato desidrogenase deve ser eficiente em plantas expostas à alta deposição de formas solúveis de N e altas temperaturas, para minimizar os efeitos do excesso de NH_4^+ em folhas.

A alta deposição de N também aumenta a susceptibilidade dos organismos a estressores secundários como extremos climáticos (Payne et al., 2019). Estes, notadamente aumentos de temperatura do ar, também afetam os processos biogeoquímicos no solo e consequentemente a biodisponibilidade de N, por alterar a decomposição da matéria orgânica e os processos de amonificação e nitrificação (Rizzetto et al., 2019). Pornon et

al. (2019), baseados em alguns estudos, concluíram que a deposição de N e o aquecimento da atmosfera podem levar a efeitos interativos na produção de biomassa e química do solo e das plantas, efeitos aditivos na riqueza e diversidade em espécies e efeitos antagônicos na retenção de N nos ecossistemas. Sendo assim, os impactos da alta deposição atmosférica de N e o aquecimento da atmosfera sobre os ecossistemas e sobre as espécies vegetais que os compõem devem ser dimensionados em conjunto (Gaudio et al., 2015). No entanto, todos esses são ainda pouco conhecidos, especialmente em florestas tropicais e subtropicais (Liu et al., 2018; Pornon et al., 2019).

1.4. Efeitos do aquecimento global e deposição atmosférica de nitrogênio sobre espécies nativa da Floresta Atlântica

Ecossistemas florestais, como a Floresta Atlântica, são responsáveis por uma multiplicidade de serviços que são fundamentais na sustentação de nutrientes, regulação do clima, proteção do solo, atuam como sequestradores de carbono, e desta forma beneficiando a vida humana. Assim como a deposição atmosférica ajuda na remoção de poluentes, remanescentes de Floresta Atlântica, próximas a fontes antrópicas de poluição, também atuam na melhoria da qualidade do ar no ambiente urbano (Martinelli et al., 2020).

Com a perda substancial das florestas, seja por conta do desmatamento, ou mudanças climáticas, estima-se que mais de 60% dos serviços ecossistêmicos globais (destaque para os oferecidos pelas florestas) tenham se perdido nos últimos 50 anos. Teme-se que com a perda destes serviços tenhamos declínio na capacidade de assimilação do carbono e de demais compostos poluentes, como o dióxido de nitrogênio (NO₂) e óxido nitroso (NO_x) produzidos pelas atividades humanas (Bobbink et al. 2010; Gilliam 2021).

Medidas têm sido tomadas com o objetivo de estabilizar os ecossistemas, dentre os esforços implementados, o mais abrangente é o programa de Redução de Emissões por Desmatamento e Degradação Florestal (REDD+) em países em desenvolvimento,

iniciado em 2008 pela Convenção - Quadro das Nações Unidas (ONU) sobre mudança no clima - UNFCCC (FAO, 2014a). O intuito do programa é reduzir as emissões nos países em desenvolvimento por meio do manejo florestal sustentável, medidas de proteção. Souza et al. (2020), em estudo sobre deposição de nitrogênio de forma orgânica e inorgânica, verificaram que as concentrações médias anuais de todos os compostos de N em áreas da Floresta Atlântica próximas a regiões urbanas foram maiores do que em regiões mais afastadas da Floresta Atlântica.

Luminati et al. (2021), utilizando modelos de regressão de uso da terra (LUR), verificaram que a população da Região Oeste de São Paulo deste local está exposta a altos níveis de NO_2 , que inclusive estão acima dos níveis estabelecidos pela OMS (Organização Mundial da Saúde). Esse resultado mostra que a alta deposição de N é um problema de saúde pública também.

Nos grandes conglomerados urbanos brasileiros, como o de São Paulo, a poluição do ar se tornou uma grande ameaça aos ecossistemas naturais. A frota veicular é uma das principais fontes de emissão destes poluentes, entre os quais se destacam os compostos nitrogenados, como N_2O e NO_x . Boccuzzi et al. (2020), por exemplo, concluíram que ocorre maior deposição de NO_2 no remanescente urbano de Floresta Atlântica incluído no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (PEFI), localizado na zona sul da cidade de São Paulo do que em trechos de floresta mais afastados das fontes urbanas de NO_2 . Além disso, maiores níveis de dióxido de carbono, metano, óxidos de nitrogênio e ozônio na atmosfera de São Paulo, que são considerados os principais gases-traço que afetam diretamente o balanço da radiação solar (IPCC, 2007), têm contribuído para aumentos de temperatura do ar em São Paulo. Segundo registros do Instituto Astronômico e Geofísico realizados de 1933 a 2013, observou-se aumento de mais de $2,0^\circ\text{C}$ na temperatura média anual no PEFI. Este aumento de temperatura foi acompanhado por uma elevação de

quase 50% dos totais anuais de precipitação pluviométrica, associada à diminuição dos dias de chuva e maior variabilidade climática (IAG, 2014).

Poucos estudos abordaram a assimilação de nitrogênio por árvores neotropicais (Debiasi et al. 2019, 2021). Pouco se conhece também sobre o metabolismo de N nas espécies arbóreas presentes em remanescentes de Floresta Atlântica próximos a fontes antrópicas de formas solúveis de N ou submetidas ao aumento de temperatura.

De acordo com Aidar et al. (2003), as espécies pioneiras de trechos preservados da Floresta Atlântica teriam alta capacidade de assimilação de NO_3^- e responderiam ao aumento da disponibilidade de N no solo quando comparadas às espécies não pioneiras. Por outro lado, Boccuzzi et al. (2020) mostraram que as espécies pioneiras dos fragmentos perturbados de Floresta Atlântica em São Paulo acumularam proporcionalmente mais N- NH_4 do que N- NO_3 . Nascimento (2019) também concluiu que plantas da bromélia *Alcantarea imperiales* submetidas ao aquecimento do ar apresentaram aumento gradativo da concentração foliar de NH_4^+ , em paralelo ao aumento da atividade da enzima glutamato desidrogenase.

De acordo com Debiasi et al. (2019, 2021), a luz é um fator de indução para o funcionamento das enzimas NR e GS, e seu efeito é contrastante entre espécies de estágios sucessionais diferentes da Floresta Atlântica. Espécies arbóreas tolerantes à sombra, como *Eugenia brasiliensis* e *Guarea kunthiana* tendem a ter menor atividade de NR e maior atividade de GS, e as intolerantes, como *Heliocarpus popayanensis* e *Cecropia pachystachya*, o inverso. Debiasi et al. (2021) acrescentaram, ainda, que as estratégias de uso de N em resposta a variações na intensidade luminosa variaram entre as espécies arbóreas estudadas de acordo com suas características ecológicas.

Em tese, as espécies não pioneiras da Floresta Atlântica seriam mais susceptíveis ao estresse induzido por aumento na disponibilidade de N no solo e ao aquecimento do ar,

com base no fato de que são menos efetivas na produção de compostos de defesas contra o estresse induzido por estressores ambientais, naturais ou de origem antrópica (Domingos et al. 2015, Brandão et al., 2017; Esposito et al., 2018).

2. HIPÓTESES

Com base na contextualização teórica apresentada, levantamos as seguintes hipóteses:

A) A alta deposição de N altera os processos de amonificação e nitrificação no solo, resultando no maior aumento da biodisponibilidade de NH_4^+ do que de NO_3^- e consequente maior concentração radicular e foliar de N- NH_4 em relação à concentração de N- NO_3 .

B) O aquecimento do ar aumenta a razão de concentração entre NH_4^+ e NO_3^- , tanto no solo quanto nas raízes e folhas das plantas, independentemente do nível de deposição de N no solo.

C) Espécies arbóreas pioneiras expostas ao excesso de N no solo e/ou à alta temperatura são mais eficientes na metabolização do excesso de NH_4^+ e NO_3^- , por meio das enzimas nitrato redutase e glutamina sintetase do que as espécies arbóreas não pioneiras.

Este projeto foi delineado visando a testar experimentalmente essas hipóteses.

3. OBJETIVOS

A) Verificar se há aumento da biodisponibilidade de NH_4^+ e NO_3^- no solo e das concentrações de N na forma desses íons nas raízes e folhas de plantas jovens de uma espécie arbórea pioneira e uma espécie arbórea não pioneira, quando cultivadas em vasos contendo solo superficial proveniente de um fragmento urbano de Floresta Atlântica, após adição de nitrogênio.

B) Verificar se o nível de atividade de uma enzima envolvida na redução de NO_3^- em NH_4^+ [nitrato redutase (NR)] e uma enzima envolvida na assimilação de N em aminoácidos a partir do NH_4^+ [glutamina sintetase (GS)], assim como as concentrações de pigmentos em folhas e parâmetros de crescimento, diferem entre as referidas espécies quando cultivadas em vasos com solo de um fragmento urbano de Floresta Atlântica, após adição de nitrogênio.

C) Qual estágio sucessionar estará mais apto a enfrentar um cenário de aquecimento global e excesso de N, e quais estratégias serão adotadas pelas espécies representativas de cada estágio sucessionar.

D) Verificar se as proporções entre NH_4^+ e NO_3^- endógeno nas folhas e raízes e concentrações de NH_4^+ e NO_3^- no solo, e se as estratégias de aproveitamento dessas formas solúveis de N pelas duas espécies são alteradas pelo aumento da temperatura do ar.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Escolha das espécies e plantio de mudas

Os experimentos foram realizados com uma espécie representante de cada grupo funcional e da Floresta Atlântica [árvore pioneira, *Croton floribundus* Spreng e árvore não pioneira: *Esenbeckia leiocarpa* Engl.].

Croton floribundus é uma espécie pioneira, muito comum de bordas e clareiras em florestas ombrófilas e estacionais do Brasil, comum em áreas degradadas, e se diferencia das outras espécies arbóreas da Floresta Atlântica por ser a única que não possui glândulas no ápice do pecíolo, folhas com a face adaxial hispida e frutos fortemente verrucosos (Santos, 2016)

Esenbeckia leiocarpa distribui-se da Bahia e Espírito Santo até Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo e sul de Mato Grosso. Habita a Mata Atlântica e matas estacionais semidecíduas do interior. Floresce de outubro a março; encontrada com frutos entre janeiro e setembro. Espécie bem individualizada pelas folhas simples opacas, oliváceas, e pelos frutos quase lisos exceto pela apófise dorsal de cada carpelo. Sua madeira clara (garantã) tem utilização frequente. (Pirani, 2020)

As espécies arbóreas foram obtidas no viveiro da CESP de Paraibuna, com altura média de 20 cm e com pelo menos quatro folhas no ramo principal.

As mudas das duas espécies foram transplantadas para vasos com capacidade de 1,7 L, contendo solo superficial (camada de 0 a 20 cm de profundidade) coletado no fragmento urbano de Mata Atlântica localizado no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (PEFI). As plantas em vasos foram, então, mantidas em casa de vegetação por pelo menos dois meses para se adaptarem ao novo substrato e retomarem o crescimento. Durante esse período de adaptação, todas as plantas foram adubadas mensalmente com 100 mL de solução nutritiva balanceada contendo macro e micronutrientes (Tabela 1), conforme método proposto por Epstein (1975). Durante esse período, as plantas em vasos receberam periodicamente o mesmo volume de água deionizada, determinado de acordo com a capacidade máxima de retenção de água do solo.

4.2. Delineamento experimental

Os experimentos utilizando as mudas envasadas de cada uma das espécies foram realizados em uma câmara de crescimento, subdividida em dois ambientes autônomos, denominados câmara 1 e câmara 2. Cada câmara contém duas bancadas de trabalho de 3,20 m de comprimento por 0,90 m de largura e cada uma delas é iluminada com 3 luminárias LEDs PAR com potência de 1.200 w. As paredes e teto das câmaras são revestidos nas duas faces em aço galvanizado, tendo como acabamento externo prime epóxi na cor branca e núcleo isolante térmico em EPS (Fig. 3). Os ventiladores para movimentação do ar no interior das câmaras são do tipo axial com balanceamento. O deslocamento de ar se dá de baixo para cima através do insuflamento por dutos instalados na base das bancadas. A renovação do ar no interior das câmaras é automática e controlada por admissores instalados na parte de baixa pressão do ventilador. O ar insuflado para dentro das câmaras passa por uma unidade de filtragem para a retenção de partículas finas e grossas (partículas a partir de 2,5 μm) e gases ozônio e óxidos de nitrogênio. A umidificação do ar é feita por água pressurizada a 1200 psi e bicos atomizadores e a secagem por choque térmico com precipitação no evaporador. O aquecimento é feito por sistema reverso de refrigeração complementado por resistência elétrica. A unidade de refrigeração é do tipo condensador a ar e compressor hermético da marca Danfoss.

As variáveis radiação e umidade relativa ao longo dos experimentos foram uniformizadas nas duas câmaras por meio de um sistema de controle PID (proporcional integral e derivada), com regime de funcionamento contínuo, garantindo estabilidade no controle dessas variáveis. Apenas a variável temperatura foi ajustada de forma diferente em cada uma das câmaras. Na câmara 1, as plantas foram mantidas em termoperíodo de 26°C dia/19°C noite, representando o cenário atual da região metropolitana de São Paulo. Na

câmara 2, as plantas foram mantidas em termoperíodo de 32°C dia/20°C, simulando a situação futura prevista de acordo com o IPCC, aumento da temperatura média em 2,4°C até o meio do século e chegar até 4,4°C até 2100(IPCC 2007).

Ao final do período de adaptação, mencionado anteriormente, as plantas envasadas foram distribuídas em 4 tratamentos:

T atual / Bal. (Temperatura atual / Balanceada): plantas mantidas sob regime diário atual de temperatura e fertilizadas com solução nutritiva balanceada (prepara conforme Tabela 1).

T atual+N (Temperatura atual + N): plantas mantidas sob regime diário atual de temperatura e fertilizadas com solução nutritiva balanceada e acrescida do dobro da concentração de N (preparada cf. Tabela 1).

T alta / Bal. (Temperatura alta / Balanceada): plantas mantidas sob regime diário futuro de temperatura e fertilizadas com solução nutritiva balanceada (preparada conforme Tabela 1).

T alta+N (Temperatura alta + N): plantas mantidas sob regime diário futuro de temperatura e fertilizadas com solução nutritiva balanceada e acrescida do dobro da concentração de N (preparada conforme Tabela 1).

Tabela 1: Solução nutritiva balanceada para o grupo de plantas controle (A) e Solução nutritiva balanceada com excesso de nitrogênio para o grupo de plantas com adubação balanceada + N (B).

Nutrientes	Bal	Bal+N
N	90.0	182.0
P	9.0	9.0
K	57.0	57.0
Ca	11.0	11.0
Mg	2.0	2.0
S	80.0	80.0
Cl	2.0	2.0
Fe	0.1	0.1
Mn	0.04	0.04
Zn	0.05	0.05
Cu	0.01	0.01
B	0.05	0.05
Mo	0.007	0.007

O experimento com cada espécie foi iniciado em esquema fatorial 2x2x4, sendo 2 regimes de temperatura, 2 doses de nitrogênio no solo e 4 retiradas semanais de mudas de cada tratamento, tendo, portanto, a duração de 28 dias. Para tanto, cada experimento foi iniciado com 96 plantas por câmara, sendo 48 plantas do tratamento 1 (cultivadas com adubação balanceada) e 48 plantas do tratamento 2 (cultivadas com adubação balanceada e acrescida do dobro de N), compondo-se 4 réplicas inteiramente casualizadas por tratamento, com 12 plantas cada. Foram retiradas 3 mudas por réplica de tratamento aos 7, 14, 21 e 28 dias de cada experimento. Raízes e folhas destas foram reunidas de modo a obter 4 amostras mistas de ambos os órgãos por tratamento a cada 7 dias.

Parte das amostras mistas de raízes e folhas, depois de separadas, foi imediatamente analisada quanto à atividade da enzima nitrato redutase (NR). Outra alíquota foi armazenada em ultrafreezer (sob -80°C) para posterior análise da atividade da enzima glutamina sintetase (GS), clorofilas a e b e carotenoides, e análises das concentrações de NH_4^+ e NO_3^- endógenos. O restante das amostras mistas foi seca em estufa (sob 40°C) para compor o peso seco de folhas e raízes.

O solo utilizado para crescimento das 3 mudas por réplica de tratamento, ao serem retiradas aos 7, 14, 21 e 28 dias de experimento, também foi reunido semanalmente para compor 4 amostras mistas por tratamento. Essas amostras foram secas ao ar e peneiradas em malha de 2 mm, para determinação das concentrações de NH_4^+ e NO_3^- .



Figura. 4: Câmaras climatizadas situadas no Laboratório de Estudos Ambientais do Instituto de Pesquisas Ambientais e utilizadas no experimento com *Croton floribundus* e *Esenbeckia leiocarpa*. Esquerda: Visão geral externa. Direita: Ambiente interno.

4.3. Técnicas analíticas

4.3.1. Concentrações de amônio e nitrato em solo e plantas

Para a extração do N nas formas de amônio (N-NH_4^+) e de nitrato (N-NO_3^-) no solo, foi utilizada uma solução extratora de cloreto de potássio ($\text{KCl } 1 \text{ mol L}^{-1}$), na proporção de 1:20 (solo/solução extratora). Após a agitação do material solubilizado, as amostras descansaram por aproximadamente 30 minutos. Do extrato resultante, foi tomada uma alíquota de 10 ml do sobrenadante e destilado em microdestilador Kjeldahl, adicionando-se óxido de magnésio (MgO) para obtenção do N-NH_4^+ e Liga de devarda para a de N-

NO_3^- . A quantificação dos teores de N nas formas de NH_4^+ e NO_3^- no destilado obtido foi realizada por meio de titulação com solução padronizada de H_2SO_4 $0,0025 \text{ mol L}^{-1}$ e indicador ácido bórico a 2% para mudança de cor na titulação. As determinações (via destilação e titulação) do N solúvel no solo foram realizadas pelo método Kjeldahl, conforme metodologia de Silva (2009) e Silva et al. (2010).

Para determinação da concentração de NH_4^+ em folhas e raízes, 0,5 g de massa fresca de cada amostra foi macerada com nitrogênio líquido. Os extratos vegetais resultantes foram transferidos para tubos, aos quais foram acrescentados 2 mL de água ultra-purificada. Essas amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm, 4°C por 10 minutos. O sobrenadante foi retirado e utilizado nas quantificações de amônio. A quantificação do amônio foi feita de acordo com a reação conhecida como fenolhipoclorito (Weatherburn, 1967; Mccullough, 1967), na qual dois reagentes serão utilizados: o reagente A e o reagente B. O primeiro foi constituído de fenol (10 g/L) e nitroprusside de sódio (50 mg/L), sendo que o segundo possui $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (53,7 g/L), hipoclorito de sódio (10-14% Cl_2) (10 ml/L) e NaOH (5 g/L). Em tubos de ensaio, foi aliquoteado 100 μl do extrato vegetal e foi adicionado 0,5 mL do reagente A e 0,5 mL do reagente B. Após agitação, a mistura permaneceu em banho-maria a 37°C por 35 minutos. Cada amostra foi lida no espectrofotômetro a 625 nm. A curva padrão foi feita utilizando-se o sulfato de amônio (NH_4) 2SO_4 . A quantificação de amônio foi expressa em μg de NH_4^+ g MS^{-1} .

O teor de nitrato em folhas e raízes foi determinado pelo método descrito por Cataldo et al. (1975). A extração foi feita a partir de tecidos congelados. Cerca de 0,1 g de folhas e 0,1 g de raízes foram macerados em almofariz com 5 ml de água ultrafiltrada em temperatura ambiente. Após a homogeneização, esses materiais foram submetidos a uma centrifugação de 15.000 rpm por 30 min, coletando-se o sobrenadante e centrifugando-o por mais 15 min a 15.000 rpm. O sobrenadante seguinte foi utilizado para as análises de

nitrato. A cada alíquota de 200 µl foram adicionados 800 µl de ácido salicílico 5% em ácido sulfúrico concentrado. Após um período de 20 min à temperatura ambiente, foram adicionados 19 ml de NaOH 2 N, elevando o pH acima de 12. A absorbância da mistura resultante foi analisada sob comprimento de onda de 410 nm.

4.3.2. Atividade das enzimas assimiladoras de N em folhas e raízes

Para a atividade da Nitrato Redutase (NR), foi utilizado o método in vivo descrito por Cataldo et al (1975). As amostras de folhas e raízes foram lavadas com água destilada, em seguida as amostras (folhas ou raízes) foram cortadas em pequenos fragmentos. Posteriormente, 0,2g de massa fresca foi depositado em tubos de ensaio contendo solução de incubação de tecidos constituída por tampão fosfato 0,1 M, n-propanol e KNO₃ (substrato da RN). O tecido vegetal, submerso nessa solução, foi infiltrado a vácuo por três vezes de 1 min. Após esse procedimento, os tubos foram mantidos, na ausência de luz, em banho-maria a 30°C. foram avaliados os efeitos da variação da concentração de KNO₃ em função do tempo de incubação, do pH, da temperatura e da concentração de n-propanol no meio de incubação. As leituras foram feitas em espectrofotômetro sob comprimento de onda de 540 nm. A atividade da enzima foi expressa em nmoles de NO₂⁻ liberados pelo tecido vegetal na solução de incubação por hora, por grama de matéria seca (nmoles de NO₂⁻.h-1g MS⁻¹).

A atividade da Glutamina Sintetase (GS) em folhas e raízes foi determinada de acordo com o método de Cammaerts & Jacobs (1985). Aproximadamente 0,25g de massa fresca foliar ou radicular foi extraída em solução tampão de Imidazol com pH 7,9 e 0,005 M de Ditiotreitól. Estas amostras foram submetidas à centrifugação de 21.000 RCF (força centrífuga relativa ou força g) à temperatura de 4°C por 20 minutos. Foi utilizado o volume total da reação enzimática de 0,5 ml, constituído por: 0,1 mM de tampão imidazol, cujo pH foi ajustado a 7,5, 49 mM de hidroxilamina, 40 mM de MgCl₂, 160

mM de glutamato e 35 mM de ATP. A reação foi iniciada ao adicionar de 200 µl do extrato enzimático e, incubação à temperatura de 35 °C por 1 hora. Após esse período a reação foi interrompida com a adição de 1mL da solução de parada, constituída por: 0,123 M de cloreto férrico, 0,25 M de HCl e 0,1225 M de ácido tricloroacético. Foram preparados microtubos correspondentes ao tempo zero (T0), ou seja, nestes a adição da solução de parada ocorreu em seguida à deposição do extrato, interrompendo, assim, a reação. A leitura da absorbância é feita em espectrofotômetro sob 540nm. O valor da absorbância de T0 foi descontado do valor da absorbância obtido para aqueles microtubos que permaneceram sob incubação. A atividade da enzima foi expressa em mmol de gama glutamil hidroxamato por hora por grama de massa seca (mmol γ GH. h⁻¹. g⁻¹ MS).

4.3.3. Concentrações de pigmentos em folhas

Os conteúdos de pigmentos fotossintetizantes (clorofilas a e b), – foram determinados em 0,100 g de massa de tecido foliar fresco, triturado em 10 mL de álcool etílico 96%. Os extratos resultantes foram centrifugados a 10.000 rpm por 10 minutos a 2 °C e a absorbância dos sobrenadantes foi determinada em espectrofotômetro em comprimentos de onda λ = 649 nm (clorofila a) e 665 nm (clorofila b) segundo Pigaata et al. (2002). Os resultados foram expressos em mg g⁻¹ de massa seca. O conteúdo de carotenoide foi obtido no mesmo extrato etanólico da análise das clorofilas, no comprimento de onda λ = 470 nm.

4.3.4. Medidas de crescimento

Foram realizadas medidas absolutas de altura e número de folhas e determinada a biomassa seca de folhas e raízes das plantas de *C. floribundus* e *E. leiocarpa* retiradas a cada 7 dias para a confecção de curvas de crescimento.

O crescimento líquido em altura e em número de folhas foi estimado nas plantas que permaneceram por 28 dias no experimento, tomando por base as medidas realizadas alguns dias antes do início do experimento.

4.4. Estatística

Os efeitos dos diferentes regimes de temperatura, adubação e tempos de avaliação na atividade de nitrato redutase e glutamina sintetase e nas concentrações de amônio, nitrato e pigmentos nas plantas de *Croton floribundus* e *Esenbeckia leiocarpa*, assim como foram buscadas por ANOVA com três fatores (Fator 1: regime de temperatura; fator 2: adubação; fator 3: tempo). Após testar a interação entre fatores, aplicou-se o teste de comparações múltiplas (método de Holm-Sidak).

Os efeitos dos diferentes regimes de temperatura e adubação no crescimento líquido em altura e em número de folhas foram buscados por ANOVA não paramétrica (teste de Kruskal-Wallis) seguida de teste de comparações múltiplas (método de Holm-Sidak).

5. RESULTADOS

5.1. Concentrações de N-NH_4^+ e N-NO_3^- no solo

As concentrações médias de nitrogênio na forma de amônio (N-NH_4^+) no solo variaram de 3,6 a 10,5 mg/Kg, no experimento realizado com plantas de *C. floribundus* e de 1,0 a 22,6 mg/Kg no experimento realizado com plantas de *E. leiocarpa* (Figura 5, Tabela 2). Em ambos os experimentos, houve efeito significativo apenas do tipo de adubação nas concentrações de N-NH_4^+ no solo e não houve interações com demais fatores. No experimento com *C. floribundus*, o solo que recebeu solução nutritiva balanceada+N (tanto em T atual / Bal+N como em T alta / Bal+N) continha significativamente mais N-NH_4^+ do que o solo adubado com solução nutritiva balanceada. O inverso ocorreu no experimento com *E. leiocarpa* (em tratamento T atual / Bal. E Talta Bal+N) (Tabela 2).

As concentrações médias de nitrogênio na forma de nitrato (N-NO_3^-) no solo variaram de 20,1 a 165,0 mg/Kg, no experimento realizado com plantas de *C. floribundus* e de 16,4 a 105,8 mg/Kg no experimento realizado com plantas de *E. leiocarpa* (Figura 5, Tabela 2). Os níveis de N-NO_3^- no solo utilizado no experimento com *C. floribundus* foram influenciados significativamente pela temperatura, adubação e tempo de amostragem, havendo interação entre adubação e tempo. A elevação da temperatura do ar reduziu significativamente a concentração de N-NO_3^- no solo em cada tratamento de adubação e em cada tempo de amostragem. Até os 21 dias do experimento, a fertilização com solução nutritiva enriquecida de N (Bal+N) promoveu o aumento do nível de N-NO_3^- no solo, quando comparado aos níveis encontrados no solo que recebeu solução nutritiva balanceada (Bal.), independentemente do regime diário de temperatura; o inverso ocorreu aos 28 dias. Além disso, a concentração de N-NO_3^- no solo utilizado para cultivo de *C. floribundus* foi gradativamente reduzida ao longo do tempo em todos os tratamentos (Tabela 2).

As concentrações de N-NO_3^- no solo utilizado para cultivar *E. leiocarpa* foram influenciados significativamente pela temperatura e adubação, sendo que o efeito de ambos dependeu do tempo de amostragem. A adubação com excesso de N (Bal+N) elevou significativamente as concentrações de N-NO_3^- no solo até 14 dias de experimento e reduziu nas duas últimas semanas. Já a elevação da temperatura do ar aumentou significativamente a concentração de N-NO_3^- no solo em cada tratamento de adubação aos 7, 14 e 28 dias. Sob regime de temperatura atual, houve redução gradativa do nível de N-NO_3^- ao longo do tempo em ambos os tratamentos de adubação. Sob temperatura elevada, o menor nível desse composto no solo foi observado aos 21 dias (Tabela 2).

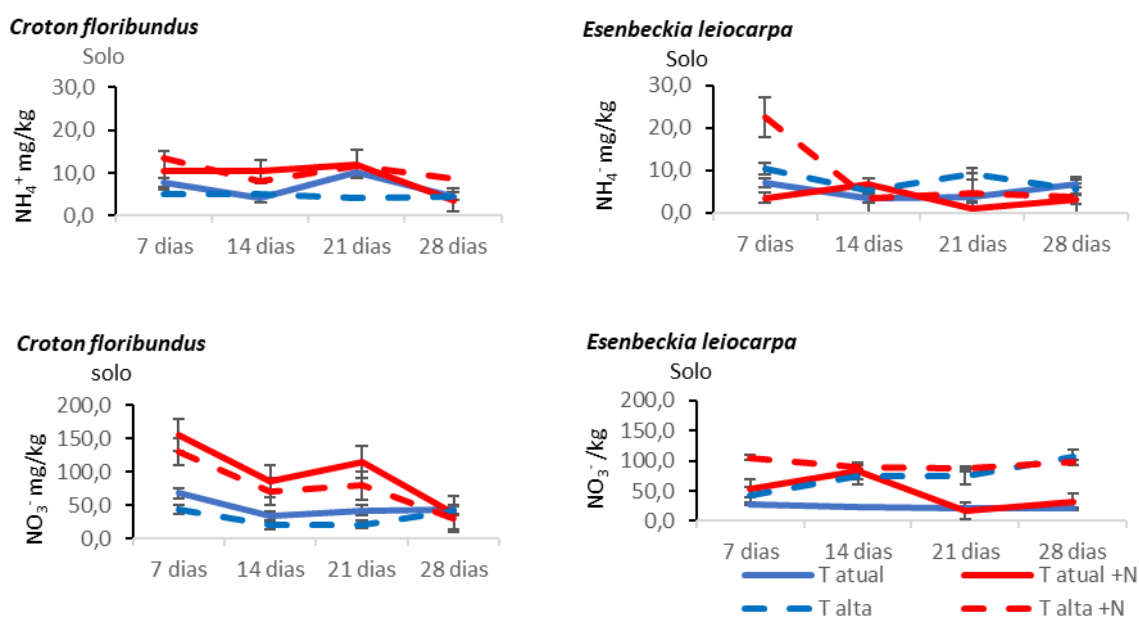


Figura.5: Concentrações médias de amônio (NH_4^+) e nitrato (NO_3^-) no solo ao longo dos 28 dias de experimento realizado com *Croton floribundus* e espécie arbórea não pioneira *Esenbeckia leiocarpa*. T atual (plantas submetidas ao termoperíodo de 26°C dia/19°C noite e adubadas com solução balanceada); T atual + N (plantas submetidas ao termoperíodo de 26°C dia/19°C noite e adubadas com solução balanceada+adição de N); T alta (plantas submetidas ao termoperíodo de 32°C dia/20°C e adubadas com solução balanceada); T alta + N (plantas submetidas ao termoperíodo de 32°C dia/20°C noite e adubadas com solução balanceada+adição de N).

Tabela 2: Valores médios das concentrações de N-NH₄ e N-NO₃ no solo (mg/kg) ao longo de 28 dias de experimento realizado com *Croton floribundus* e *Esenbeckia leiocarpa* e valores de p resultantes da ANOVA fatorial (Fator 1: regime de temperatura; fator 2: adubação; fator 3: tempo). Letras minúsculas distintas indicam diferenças entre tempos de amostragem dentro de cada tratamento de adubação e de temperatura. Médias destacadas em negrito indicam efeito significativo da adubação (Bal. vs +N) em cada tratamento de temperatura e em cada tempo de amostragem. * Indica efeito de temperatura (T atual vs T alta) em cada tratamento de adubação e cada tempo de amostragem. Somente diferenças significativas foram destacadas.

Tempo de amostragem (dias)	<i>Croton floribundus</i>				<i>Esenbeckia leiocarpa</i>			
	T atual	T alta			T atual	T alta		
	Bal.	Bal+N	Bal.	Bal+N	Bal.	Bal+N	Bal	Bal+N
N-NH₄								
7	7,8	10,5	5,0	13,4	7,0	3,4	10,3	22,6
14	4,2	10,4	5,0	8,0	3,3	6,8	5,1	3,4
21	10,2	12,0	4,2	4,6	3,7	1,0	9,1	4,6
28	4,6	3,6	4,6	8,7	6,8	3,1	5,6	3,6
ANOVA p								
<i>Fator 1</i> 0,467								
<i>Fator 2</i> <u>0,001</u>								
<i>Fator 3</i> 0,112								
Interações								
<i>1 x 2</i> 0,108								
<i>1 x 3</i> 0,530								
<i>2 x 3</i> 0,523								
<i>1 x 2 x 3</i> 0,378								
N-NO₃								
7	68,0 a *	165,0 a*	43,4 a	130,0 a	28,1 a	54,1 a	43,3 a *	104,8 a*
14	33,0 d *	85,4 c*	20,1 d	70,4 c	24,0 a	57,9 a	74,2 ab *	111,0 ab*
21	42,2 cd *	114,6 b*	20,7 cd	79,0 b	22,0 b	17,0 b	22,0 b	17,0 b
28	43,2 b *	38,8 d *	51,5 b	29,5 d	21,5 b	16,4 b	105,8 a*	97,6 ab*
ANOVA p								
<i>Fator 1</i> <u><0,001</u>								
<i>Fator 2</i> <u><0,001</u>								
<i>Fator 3</i> <u><0,001</u>								
Interações								
<i>1 x 2</i> 0,382								
<i>1 x 3</i> 0,168								
<i>2 x 3</i> <u><0,001</u>								
<i>1 x 2 x 3</i> 0,896								

T atual: Plantas submetidas ao termoperíodo diário de 26°C dia/19°C noite; **T alta:** Plantas submetidas ao termoperíodo de 32°C dia/20°C noite; **Bal.:** Plantas adubadas com solução nutritiva balanceada; **+N:** plantas adubadas com solução nutritiva balanceada e acrescida do dobro da concentração de N.

Apesar das concentrações de N-NH₄ e de N-NO₃ no solo utilizado para cultivo de plantas de *C. floribundus* terem sido influenciadas pelo tipo de adubação e pelo termoperíodo diário, a razão entre ambos os compostos foi apenas alterada ao longo do tempo. Os

menores valores foram estimados aos 14 dias em todos os tratamentos de adubação e de termoperíodo. No solo de cultivo de *E. leiocarpa*, a razão $N-NH_4/N-NO_3$ foi significativamente mais alta sob termoperíodo atual e após fertilização com solução nutritiva balanceada (Bal.) e esse efeito dependeu do momento de amostragem. Observou-se redução significativa dessa razão ao longo do tempo de experimento com *E. leiocarpa*, especialmente sob temperatura alta (Tabela 3).

Tabela 3: Valores médios da razão NH_4 / NO_3 no solo ao longo de 28 dias de experimento realizado com *Croton floribundus* e *Esenbeckia leiocarpa* e valores de p resultantes da ANOVA fatorial (Fator 1: regime de temperatura; fator 2: adubação; fator 3: tempo). Letras minúsculas distintas indicam diferenças entre tempos de amostragem dentro de cada tratamento de adubação e de temperatura. Médias destacadas em negrito indicam efeito significativo da adubação (Bal. vs +N) em cada tratamento de temperatura e em cada tempo de amostragem. * Indica efeito de temperatura (T atual vs T alta) em cada tratamento de adubação e em cada tempo de amostragem. Somente diferenças significativas foram destacadas.

Tempo de amostragem (dias)	<i>Croton floribundus</i>				<i>Esenbeckia leiocarpa</i>			
	T atual		T alta		T atual		T alta	
	Bal.	+N	Bal.	+N	Bal.	+N	Bal.	+N
7	0,11 a	0,16 a	0,22 a	0,14 a	0,39 a*	0,18 a	0,27 ab	0,32 ab
14	0,06 b	0,12 b	0,10 b	0,15 b	0,07 a	0,13 a	0,19 a	0,15 a
21	0,12 ab	0,30 ab	0,19 ab	0,16 ab	0,27 a*	0,08 a	0,09 bc	0,05 bc
28	0,10 ab	0,11 ab	0,15 ab	0,22 ab	0,25 b*	0,05 b	0,07 c	0,06 c
ANOVA		p			ANOVA		p	
Fator 1		0,764			Fator 1		<0,001	
Fator 2		0,125			Fator 2		0,003	
Fator 3		0,048			Fator 3		0,105	
Interações					Interações			
1 x 2		0,764			1 x 2		0,037	
1 x 3		0,870			1 x 3		0,016	
2 x 3		0,635			2 x 3		0,539	
1 x 2 x 3		0,870			1 x 2 x 3		0,779	

T atual: Plantas submetidas ao termoperíodo diário de 26°C dia/19°C noite; **T alta:** Plantas submetidas ao termoperíodo de 32°C dia/20°C noite; **Bal.:** Plantas adubadas com solução nutritiva balanceada; **+N:** plantas adubadas com solução nutritiva balanceada e acrescida do dobro da concentração de N.

5.2. Concentrações de NH_4^+ e NO_3^- em folhas e raízes

As concentrações foliares de NH_4^+ variaram de 32,6 a 224,3 $\mu g/g$ MS em *C. floribundus* e de 31,3 a 197,0 $\mu g/g$ MS em *E. leiocarpa*. Nas raízes, os níveis desse composto permaneceram entre 12,1 e 375,6 $\mu g/g$ MS e entre 20,9 e 101,0 $\mu g/g$ MS em plantas de *C. floribundus* e *E. leiocarpa* respectivamente (Figura 6, Tabela 4).

Os níveis foliares de NH_4^+ em *C. floribundus* foram alterados significativamente apenas pelo tipo de adubação, efeito que dependeu do momento da amostragem. Tanto sob

regime de T atual quanto de T alta, a adubação com excesso de N (Bal+N) resultou na redução das concentrações foliares de NH_4^+ em comparação com plantas adubadas com solução nutritiva balanceada. Nas raízes de *C. floribundus*, houve efeito significativo do tratamento de adubação e tempo de amostragem, assim como interação entre esses fatores. Sob T atual e T alta, o excesso de N também resultou na redução do nível radicular de NH_4^+ , quando comparado ao valor obtido no tratamento com adubação balanceada, porém somente após 7 dias. Após esse mesmo intervalo de tempo, o nível de NH_4^+ nas raízes foi o mais alto nas plantas adubadas com solução balanceada (Bal.) comparado aos valores obtidos nos demais dias, sob os 2 regimes de T. Esse efeito temporal não foi observado nas plantas adubadas com excesso de N (Figura 6, Tabela 4). O NH_4^+ em folhas de *E. leiocarpa* foi detectado apenas até os 14 dias de experimento, permanecendo abaixo do limite de detecção na segunda metade do experimento em todos os tratamentos. A concentração foliar de NH_4^+ aumentou significativamente aos 14 dias, comparada à obtida aos 7 dias, apenas nas plantas que receberam solução nutritiva balanceada, independentemente do regime de T a que foram submetidas. Em raízes de *E. leiocarpa* houve interação significativa entre tempo, temperatura e tratamento, tendo sido comprovado aumento significativo dos teores radiculares de NH_4^+ somente aos 28 dias, em relação às amostragens realizadas anteriormente, no tratamento com adubação balanceada (Bal.) e sob T alta (termoperíodo de 32°C dia/20°C noite) (Figura 6, Tabela 4).

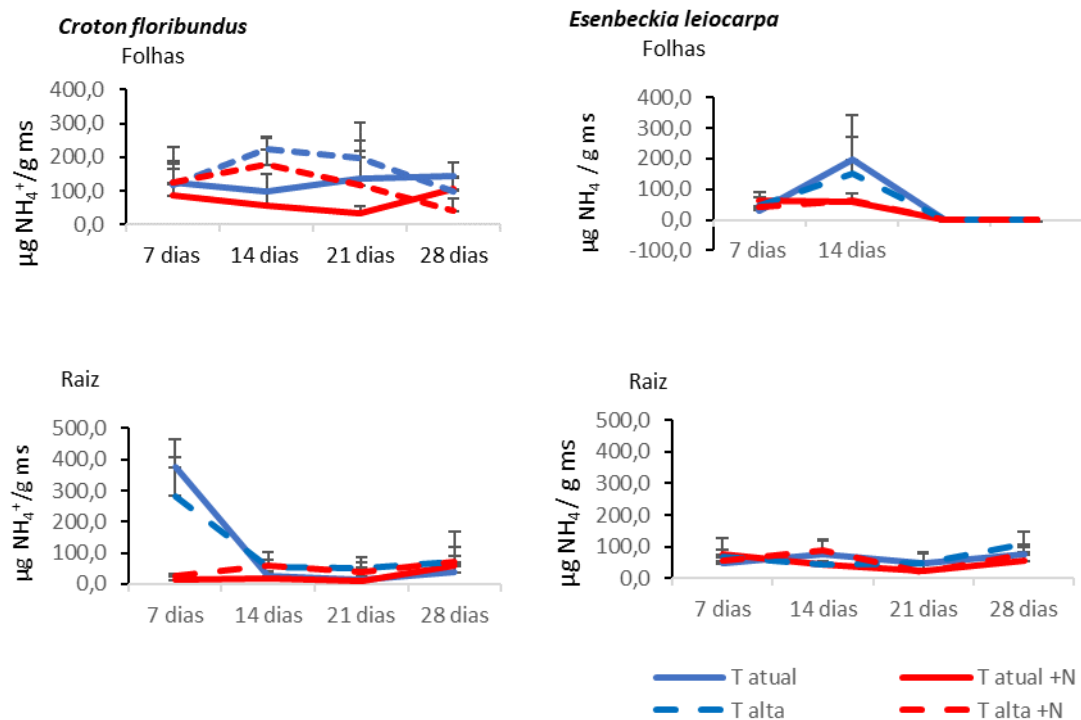


Figura 6: Concentrações médias de amônio endógeno (NH_4^+) em folhas e raízes de *Croton floribundus* e *Esenbeckia leiocarpa* ao longo dos 28 dias de experimento. T atual (plantas submetidas ao termoperíodo de 26°C dia/19°C noite e adubadas com solução balanceada); T atual + N (plantas submetidas ao termoperíodo de 26°C dia/19°C noite e adubadas com solução balanceada+adição de N); T alta (plantas submetidas ao termoperíodo de 32°C dia/20°C e adubadas com solução balanceada); T alta + N (plantas submetidas ao termoperíodo de 32°C dia/20°C noite e adubadas com solução balanceada+adição de N).

Tabela 4: Valores médios das concentrações de N-NH₄ (μg NH₄⁺ /g MS) em folhas e raízes de *Croton floribundus* e *Esenbeckia leiocarpa* ao longo de 28 dias de experimento e valores de p resultantes da ANOVA fatorial (Fator 1: regime de temperatura; fator 2: adubação; fator 3: tempo). Letras minúsculas distintas indicam diferenças entre tempos de amostragem dentro de cada tratamento de adubação e de temperatura. Médias destacadas em negrito indicam efeito significativo da adubação (**Bal. vs +N**) em cada tratamento de temperatura e em cada tempo de amostragem. * Indica efeito de temperatura (**T atual vs T alta**) em cada tratamento de adubação e cada tempo de amostragem. Somente diferenças significativas foram destacadas.

Tempo de amostragem (dias)	<i>Croton floribundus</i>				<i>Esenbeckia leiocarpa</i>			
	T atual		T alta		T atual		T alta	
	Bal.	+N	Bal.	+N	Bal.	+N	Bal	+N
Folhas								
7	125,6	85,2	118,3	123,2	31,3 b	64,6	47,0 b	43,3
14	98,5	57,6	224,3	177,0	197,8 a	56,9	151,4 a	63,4
21	135,5	32,6	198,2	99,0	nd	nd	nd	nd
28	123,2	177,0	116,2	41,1	nd	nd	nd	nd
	ANOVA	p			ANOVA	p		
	Fator 1	0,047			Fator 1	0,636		
	Fator 2	<u><0,001</u>			Fator 2	0,914		
	Fator 3	0,497			Fator 3	<u>0,019</u>		
	Interações				Interações			
	1 x 2	0,657			1 x 2	0,383		
	1 x 3	0,475			1 x 3	0,603		
	2 x 3	<u>0,013</u>			2 x 3	0,363		
	1 x 2 x 3	0,563			1 x 2 x 3	0,945		
Raízes								
7	375,6 a	13,1	283,3 a	24,9	46,6	74,9	68,0 b	57,1
14	24,6 b	0,7	53,5 b	61,0	77,5	42,8	42,0 b	89,5
21	12,1 b	10,4	52,2 b	39,8	49,7	22,6	46,6 b	20,9
28	37,7 b	59,8	71,8 b	71,8	74,7	55,1	108,0 a	76,9
	ANOVA	p			ANOVA	p		
	Fator 1	0,333			Fator 1	0,265		
	Fator 2	<u>0,001</u>			Fator 2	0,210		
	Fator 3	<u><0,001</u>			Fator 3	<u>0,001</u>		
	Interações				Interações			
	1 x 2	0,427			1 x 2	0,568		
	1 x 3	0,138			1 x 3	0,499		
	2 x 3	<u><0,001</u>			2 x 3	0,161		
	1 x 2 x 3	0,353			1 x 2 x 3	<u>0,028</u>		

T atual: Plantas submetidas ao termoperíodo diário de 26°C dia/19°C noite; **T alta:** Plantas submetidas ao termoperíodo de 32°C dia/20°C noite; **Bal.:** Plantas adubadas com solução nutritiva balanceada; **+N:** plantas adubadas com solução nutritiva balanceada e acrescida do dobro da concentração de N.

As concentrações foliares médias de NO₃⁻ variaram de 0,9 a 3,2 mg/g MS em *C. floribundus* e de 1,6 a 2,9 mg/g MS em *E. leiocarpa*. Nas raízes, os níveis desse composto permaneceram entre 0,2 e 1,1 mg/g MS e entre 0,4 e 1,5 mg/g MS em plantas de *C. floribundus* e *E. leiocarpa* respectivamente (Figura 7, Tabela 5).

Os teores de NO₃⁻ nas folhas de ambas as espécies variaram significativamente ao longo do tempo do experimento, aumentando significativamente a partir dos 14 dias em todos

os tratamentos. Não houve efeito significativo dos tratamentos de adubação e termoperíodo. Em raízes de ambas as espécies, o conteúdo de NO_3^- também variou ao longo do tempo somente e foi significativamente mais alto aos 28 dias, em todos os tratamentos (Figura 7 Tabela 5).

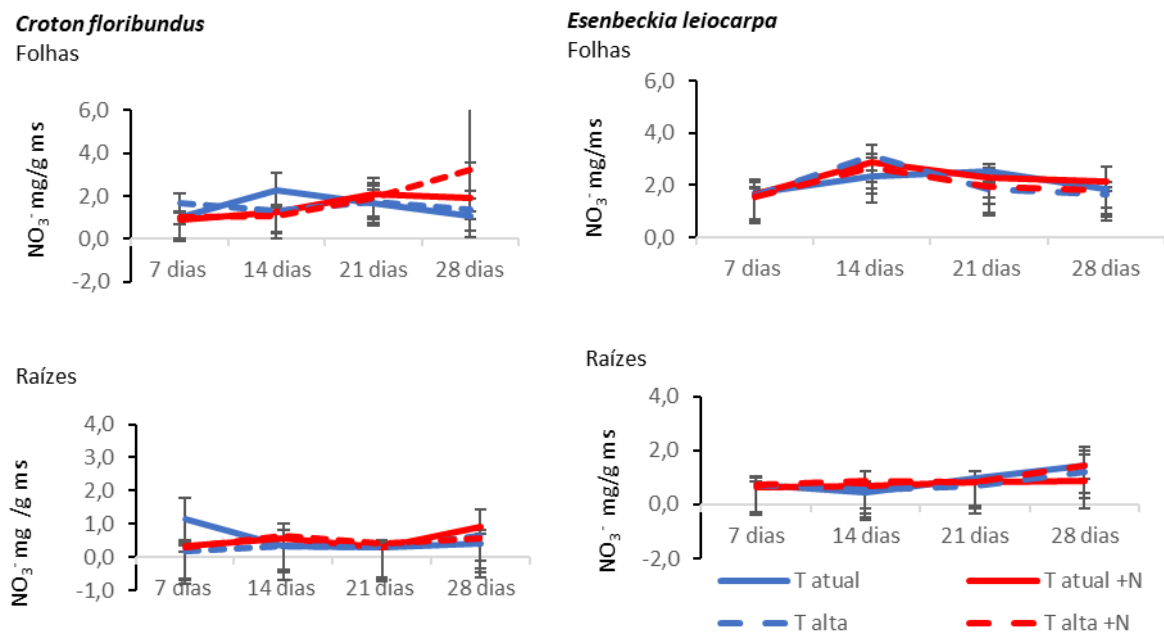


Figura.7:Concentrações médias de nitrato endógeno (NO_3^-) em folhas e raízes de *Croton floribundus* e *Esenbeckia leiocarpa* ao longo dos 28 dias de experimento T atual (plantas submetidas ao termoperíodo de 26°C dia/19°C noite e adubadas com solução balanceada); T atual + N (plantas submetidas ao termoperíodo de 26°C dia/19°C noite e adubadas com solução balanceada+adição de N); T alta (plantas submetidas ao termoperíodo de 32°C dia/20°C e adubadas com solução balanceada); T alta + N (plantas submetidas ao termoperíodo de 32°C dia/20°C noite e adubadas com solução balanceada+adição de N).

Tabela 5: Valores médios das concentrações de N-NO_3^- ($\mu\text{g NO}_3^-/\text{g MS}$) em folhas e raízes de *Croton floribundus* e *Esenbeckia leiocarpa* ao longo de 28 dias de experimento e valores de p resultantes da ANOVA fatorial (Fator 1: regime de temperatura; fator 2: adubação; fator 3: tempo). Letras minúsculas distintas indicam diferenças entre tempos de amostragem dentro de cada tratamento de adubação e de temperatura. Médias destacadas em negrito indicam efeito significativo da adubação (Bal. vs +N) em cada tratamento de temperatura e em cada tempo de amostragem. * Indica efeito de temperatura (T atual vs T alta) em cada tratamento de adubação e cada tempo de amostragem. Somente diferenças significativas foram destacadas.

Tempo de amostragem (dias)	Croton floribundus				Esenbeckia leiocarpa			
	T atual		T alta		T atual		T alta	
	Bal.	+N	Bal.	+N	Bal.	+N	Bal.	+N
Folhas								
7	1,0 b	0,9 b	1,7 b	1,0 b	1,7 c	1,7 c	1,6 c	1,6 c
14	2,2 ab	1,2 ab	1,3 ab	1,0 ab	2,3 a	2,9 a	3,1 a	2,7 a
21	1,6 a	2,1 a	1,7 a	1,9 a	2,5 a	2,3 a	1,8 a	1,9 a
28	1,1 ab	1,9 ab	1,4 ab	3,2 ab	1,8 b	2,2 b	1,7 b	1,8 b
	ANOVA	p			ANOVA	p		
	Fator 1	0,884			Fator 1	0,068		
	Fator 2	0,224			Fator 2	0,789		
	Fator 3	<u>0,005</u>			Fator 3	<u><0,001</u>		
	Interações				Interações			
	1 x 2	0,966			1 x 2	0,401		
	1 x 3	0,059			1 x 3	0,113		
	2 x 3	0,084			2 x 3	0,695		
	1 x 2 x 3	0,365			1 x 2 x 3	0,316		
Raízes								
7	1,1 ab	0,3 ab	0,2 ab	0,3 ab	0,8 b	0,6 b	0,7 b	0,7 ab
14	0,3 ab	0,5 ab	0,3 ab	0,6 ab	0,4 b	0,7 b	0,6 b	0,8 b
21	0,3 b	0,3 b	0,3 b	0,4 b	1,0 ab	0,8 ab	0,7 ab	0,8 ab
28	0,4 a	0,9 a	0,6 a	0,6 a	1,5 a	0,9 a	1,2 a	1,4 a
	ANOVA	p			ANOVA	p		
	Fator 1	0,110			Fator 1	0,807		
	Fator 2	0,254			Fator 2	0,891		
	Fator 3	<u>0,029</u>			Fator 3	<u>0,002</u>		
	Interações				Interações			
	1 x 2	0,113			1 x 2	0,388		
	1 x 3	0,093			1 x 3	0,592		
	2 x 3	0,060			2 x 3	0,108		
	1 x 2 x 3	0,229			1 x 2 x 3	0,924		

T atual: Plantas submetidas ao termoperíodo diário de 26°C dia/19°C noite; **T alta:** Plantas submetidas ao termoperíodo de 32°C dia/20°C noite; **Bal.:** Plantas adubadas com solução nutritiva balanceada; **+N:** plantas adubadas com solução nutritiva balanceada e acrescida do dobro da concentração de N.

5.3. Atividade das enzimas nitrato redutase e glutamina sintetase em folhas e raízes

A atividade da enzima nitrato redutase (NR) variou de 3,3 a 13,6 $\mu\text{mol NO}_2^-/\text{h/g MS}$ nas folhas de *C. floribundus* e de 0,3 a 3,0 $\mu\text{mol NO}_2^-/\text{h/g MS}$ nas folhas de *E. leiocarpa*. Nas raízes, os níveis de atividade dessa enzima variaram entre 0,01 e 0,53 $\mu\text{mol NO}_2^-/\text{h/g MS}$ e entre 0,02 e 1,66 $\mu\text{mol NO}_2^-/\text{h/g MS}$ em plantas de *C. floribundus* e *E. leiocarpa* respectivamente (Figura 8, Tabela 6).

A ANOVA fatorial mostrou que houve variações significativas na atividade de NR em folhas de *C. floribundus* em função do regime de temperatura, do nível de adubação nitrogenada e ao longo do tempo; porém o efeito do nível de adubação dependeu do tempo em que as plantas estiveram expostas. Altas temperaturas ao longo dos dias do experimento aumentaram a atividade da NR nas folhas de *C. floribundus*, em relação à atividade medida em plantas expostas ao regime atual de temperatura, independentemente do tempo de medição e do nível de adubação nitrogenada. A atividade da NR foi significativamente mais alta nas folhas de plantas que receberam adubação com maior concentração de N quando comparada à de folhas de plantas que receberam adubação balanceada, após 21 e 28 dias de experimento realizado sob T atual e T alta. A atividade da NR nas folhas de *C. floribundus* decresceu ao longo do tempo em todos os tratamentos. Nas raízes de *C. floribundus*, não houve efeito significativo da elevação de temperatura e do tipo de adubação na atividade da NR. Mas, a atividade da enzima diminuiu significativamente ao longo das semanas do experimento somente em plantas adubadas com solução nutritiva balanceada independente do regime diário de temperatura a que foram submetidas (Figura 8 Tabela 6).

A elevação da temperatura não afetou significativamente a atividade da NR nas folhas de *E. leiocarpa*. A adubação com excesso de N, por sua vez, promoveu o aumento da atividade da NR após 21 e 28 dias e sob regime de temperatura atual. O pico de atividade da NR nos 4 tratamentos ocorreu aos 14 dias. Nas raízes, também houve redução significativa da atividade da NR ao longo do tempo. A atividade da enzima nas raízes não foi mais detectada aos 28 dias do experimento nos 4 tratamentos (Figura 8, Tabela 6)

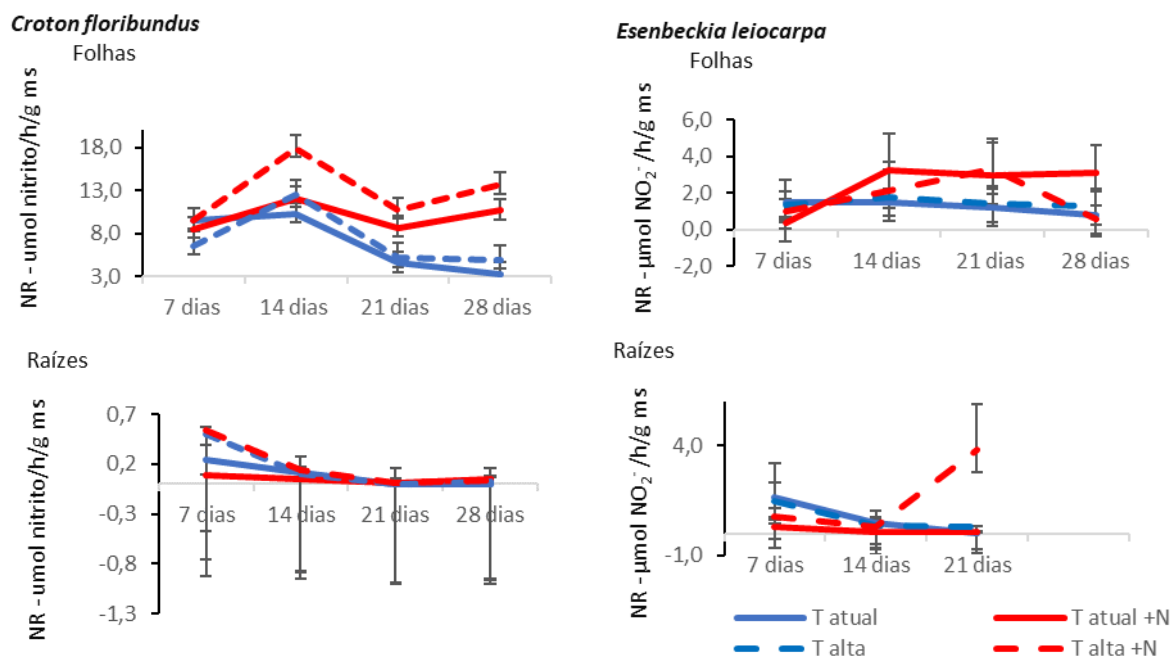


Figura. 8: Valores médios da atividade da enzima nitrato redutase (NR) em folhas e raízes de *Croton floribundus* e *Esenbeckia leiocarpa* ao longo dos 28 dias de experimento. T atual (plantas submetidas ao termoperíodo de 26°C dia/19°C noite e adubadas com solução balanceada); T atual + N (plantas submetidas ao termoperíodo de 26°C dia/19°C noite e adubadas com solução balanceada+adição de N); T alta (plantas submetidas ao termoperíodo de 32°C dia/20°C e adubadas com solução balanceada); T alta + N (plantas submetidas ao termoperíodo de 32°C dia/20°C noite e adubadas com solução balanceada+adição de N).

Tabela 6: Valores médios da atividade da enzima nitrato redutase ($\mu\text{mol NO}_2^-/\text{h/g MS}$) em folhas e raízes de *Croton floribundus* e *Esenbeckia leiocarpa* ao longo de 28 dias de experimento e valores de p resultantes da ANOVA fatorial (Fator 1: regime de temperatura; fator 2: adubação; fator 3: tempo). Letras minúsculas distintas indicam diferenças entre tempos de amostragem dentro de cada tratamento de adubação e de temperatura. Médias destacadas em negrito indicam efeito significativo da adubação (Bal. vs +N) em cada tratamento de temperatura e em cada tempo de amostragem. * Indica efeito de temperatura (T atual vs T alta) em cada tratamento de adubação e cada tempo de amostragem. Somente diferenças significativas foram destacadas.

Tempo de amostragem (dias)	<i>Croton floribundus</i>				<i>Esenbeckia leiocarpa</i>			
	T atual		T alta		T atual		T alta	
	Bal.	+N	Bal.	+N	Bal.	+N	Bal.	+N
Folhas								
7	9,5 b	8,5 b	6,5 ab*	9,5 b*	1,5 a	0,3 ab	1,4 a	1,0 ab
14	10,3 a	12,0 a	12,5 a*	17,9 a*	1,5 a	3,2 a	1,8 a	2,2 a
21	4,5 b	8,7 b	5,1 b*	10,7 b*	1,2 a	3,0 b	1,4 a	1,3 b
28	3,3 b	10,7 b	4,9 b*	13,6 b*	0,8 b	3,1 ab	1,3 b	0,6 ab
	ANOVA	p			ANOVA	p		
	Fator 1	<u>0,035</u>			Fator 1	0,495		
	Fator 2	<u><0,001</u>			Fator 2	<u>0,019</u>		
	Fator 3	<u><0,001</u>			Fator 3	<u>0,022</u>		
	Interações				Interações			
	1 x 2	0,093			1 x 2	0,171		
	1 x 3	0,153			1 x 3	0,392		
	2 x 3	<u>0,020</u>			2 x 3	<u>0,027</u>		
	1 x 2 x 3	0,885			1 x 2 x 3	0,133		
Raízes								
7	0,24 a	0,08	0,50 a	0,53	1,66 a	0,34 a	1,46 a	0,76 a
14	0,11 b	0,05	0,10 b	0,13	0,50 b	0,05 b	0,34 b	0,29 b
21	0,01 c	0,01	0,01 c	0,01	0,02 b	0,09 b	0,29 b	0,93 b
28	0,01 c	0,05	0,03 c	0,04	nd	nd	nd	nd
	ANOVA	p			ANOVA	p		
	Fator 1	0,050			Fator 1	0,377		
	Fator 2	0,835			Fator 2	0,784		
	Fator 3	<u><0,001</u>			Fator 3	<u>0,009</u>		
	Interações				Interações			
	1 x 2	<u>0,030</u>			1 x 2	0,241		
	1 x 3	<u>0,013</u>			1 x 3	0,748		
	2 x 3	0,715			2 x 3	0,346		
	1 x 2 x 3	0,277			1 x 2 x 3	0,912		

T atual: Plantas submetidas ao termoperíodo diário de 26°C dia/19°C noite; **T alta:** Plantas submetidas ao termoperíodo de 32°C dia/20°C noite; **Bal.:** Plantas adubadas com solução nutritiva balanceada; **+N:** plantas adubadas com solução nutritiva balanceada e acrescida do dobro da concentração de N.

A atividade da enzima glutamina sintetase (GS) variou de 4,4 a 37,1 $\mu\text{mol GGH/h/g MS}$ nas folhas de *C. floribundus* e de 21,1 a 353,8 $\mu\text{mol GGH/h/g MS}$ nas folhas de *E. leiocarpa*. Nas raízes, os níveis de atividade dessa enzima variaram entre 2,3 e 9,5 $\mu\text{mol GGH/h/g MS}$ e entre 13,4 e 55,1 $\mu\text{mol GGH/h/g MS}$ em plantas de *C. floribundus* e *E. leiocarpa* respectivamente (Figura 9 Tabela 7).

A ANOVA fatorial mostrou que não houve variações significativas em função do regime diário de temperatura, do tipo de adubação e ao longo do tempo na atividade da GS nas folhas e raízes das plantas de *C. floribundus* (Figura 9, Tabela 7).

A atividade da GS variou significativamente nas folhas e raízes de plantas de *E. leiocarpa* apenas em função do tempo, nas plantas expostas aos 2 regimes de temperatura e aos 2 níveis de adubação com N. O pico de atividade da enzima nas folhas ocorreu entre 14 e 21 dias e nas raízes entre 21 e 28 dias. Os demais fatores não alteraram significativamente a atividade de GS nas folhas e raízes de *E. leiocarpa* (Figura 9 Tabela 7).

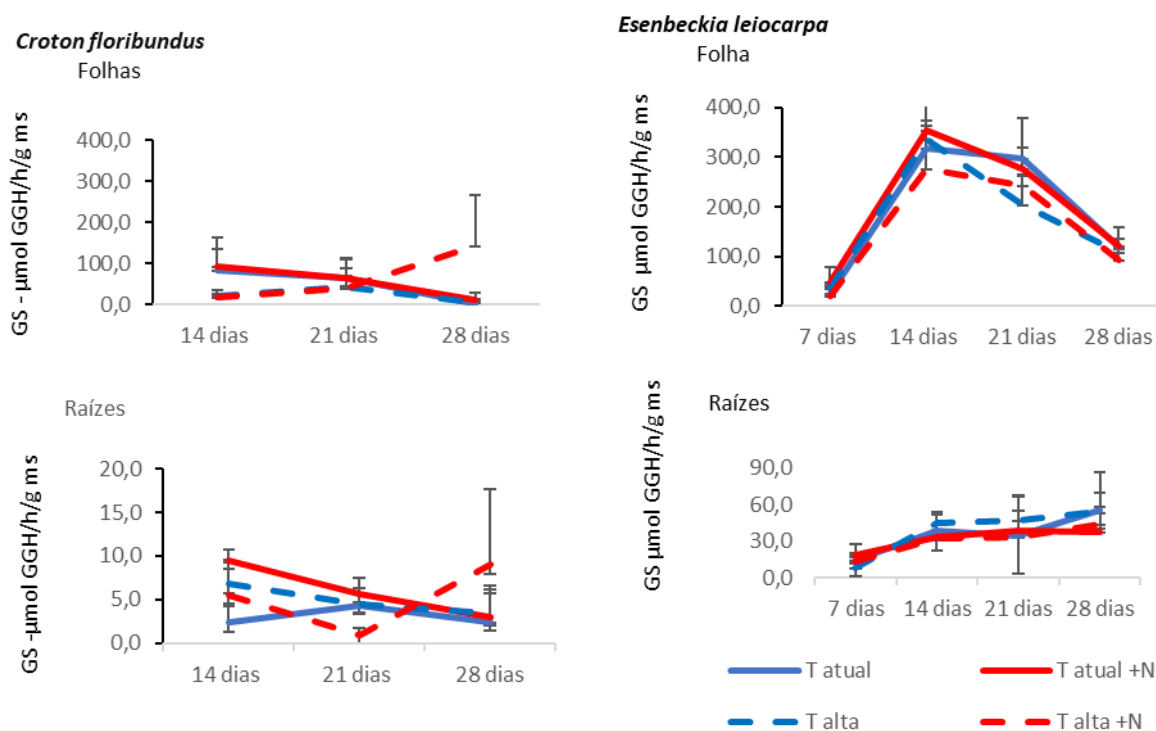


Figura. 9: Valores médios da atividade da enzima glutamina sintetase (GS) em folhas e raízes de *Croton floribundus* e *Esenbeckia leiocarpa* ao longo dos 28 dias de experimento. T atual (plantas submetidas ao termoperíodo de 26°C dia/19°C noite e adubadas com solução balanceada); T atual + N (plantas submetidas ao termoperíodo de 26°C dia/19°C noite e adubadas com solução balanceada+adição de N); T alta (plantas submetidas ao termoperíodo de 32°C dia/20°C e adubadas com solução balanceada); T alta + N (plantas submetidas ao termoperíodo de 32°C dia/20°C noite e adubadas com solução balanceada+adição de N).

Tabela 7: Valores médios da atividade da enzima glutamina sintetase (GS) ($\mu\text{mol GGH/h/gMS}$) em folhas e raízes de *Croton floribundus* e *Esenbeckia leiocarpa* ao longo de 28 dias de experimento e valores de p resultantes da ANOVA fatorial (Fator 1: regime de temperatura; fator 2: adubação; fator 3: tempo). Letras minúsculas distintas indicam diferenças entre tempos de amostragem dentro de cada tratamento de adubação e de temperatura. Médias destacadas em negrito indicam efeito significativo da adubação (Bal. vs +N) em cada tratamento de temperatura e em cada tempo de amostragem. * Indica efeito de temperatura (T atual vs T alta) em cada tratamento de adubação e cada tempo de amostragem. Somente diferenças significativas foram destacadas.

Tempo de amostragem (dias)	Croton floribundus				Esenbeckia leiocarpa			
	T atual Bal.	+N	T alta Bal.	+N	T atual Bal.	+N	T alta Bal	+N
Folhas								
7	-	-	-	-	25,5 d	47,6 d	36,6 d	21,1 d
14	33,3	37,1	8,8	6,7	317,5 a	353,8 a	335,5 a	276,9 a
21	23,7	34,7	10,8	13,2	296,4 b	275,8 b	203,6 b	241,7 b
28	5,9	11,2	4,4	31,2	118,1 c	121,4 c	108,2 c	92,8 c
	ANOVA	p			ANOVA	p		
	Fator 1	0,253			Fator 1	0,060		
	Fator 2	0,119			Fator 2	0,632		
	Fator 3	0,219			Fator 3	<0,001		
	Interações				Interações			
	1 x 2	0,275			1 x 2	0,324		
	1 x 3	0,049			1 x 3	0,736		
	2 x 3	0,183			2 x 3	0,337		
	1 x 2 x 3	0,608			1 x 2 x 3	0,250		
Raízes								
7	-	-	-	-	14,7 b	18,7 b	8,3 b	13,4 b
14	2,3	9,5	6,8	5,5	38,4 a	33,3 a	44,6 a	32,0 a
21	4,4	5,7	4,5	0,9	34,8 a	39,1 a	47,4 a	33,5 a
28	2,4	3,1	3,4	9,0	55,1 a	37,5 a	53,8 a	43,8 a
	ANOVA	p			ANOVA	p		
	Fator 1	0,989			Fator 1	0,735		
	Fator 2	0,247			Fator 2	0,307		
	Fator 3	0,206			Fator 3	<0,001		
	Interações				Interações			
	1 x 2	0,078			1 x 2	0,942		
	1 x 3	0,180			1 x 3	0,406		
	2 x 3	0,220			2 x 3	0,541		
	1 x 2 x 3	0,123			1 x 2 x 3	0,399		

T atual: Plantas submetidas ao termoperíodo diário de 26°C dia/19°C noite; **T alta:** Plantas submetidas ao termoperíodo de 32°C dia/20°C noite; **Bal.:** Plantas adubadas com solução nutritiva balanceada; **+N:** plantas adubadas com solução nutritiva balanceada e acrescida do dobro da concentração de N.

5.4. Concentrações de pigmentos em folhas

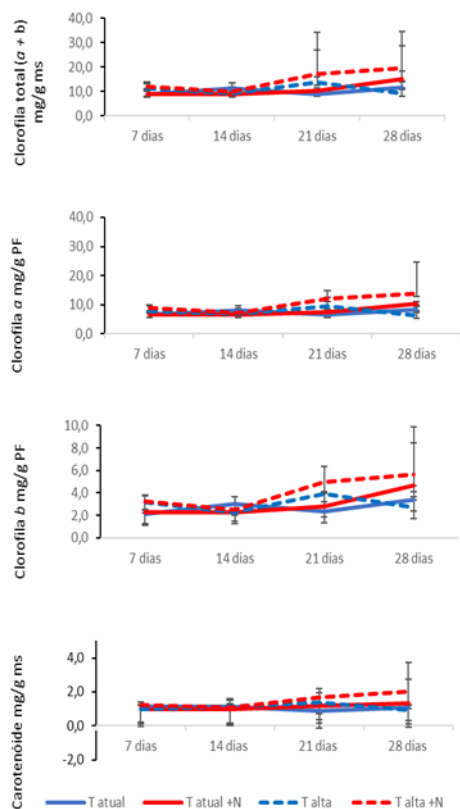
As concentrações foliares médias de clorofila total variaram de 8,7 (*a*: 6,4; *b*: 2,3) a 19,4 (*a*: 13,8; *b*: 5,6) mg/g MS nas folhas de *C. floribundus* e de 2,8 (*a*: 2,1; *b*: 0,7) a 5,0 (*a*: 3,7; *b*: 1,3) mg/g MS nas folhas de *E. leiocarpa* (Figura 10, Tabelas 8).

Os fatores regime de temperatura, adubação e tempo não alteraram significativamente os níveis foliares de clorofilas total e *a* das 2 espécies. Porém, algumas interações pontuais entre os fatores foram identificadas pela ANOVA. As concentrações de clorofila total e *a* foram significativamente mais altas aos 28 dias nas plantas de *C. floribundus* adubadas com solução nutritiva balanceada e expostas ao termoperíodo atual. A temperatura alta promoveu o aumento da clorofila total, após 7 dias, nas plantas de *E. leiocarpa* adubadas com ambos os tipos de solução nutritiva, em relação aos valores obtidos nas plantas crescidas sob regime atual de temperatura. A concentração de clorofila *a* reduziu significativamente aos 28 dias nas plantas fertilizadas com solução balanceada e sob temperatura elevada (Figura 10, Tabelas 9).

O conteúdo de clorofila *b* de plantas de *C. floribundus* expostas ao regime de temperatura atual aumentou significativamente ao longo do tempo, independentemente do tipo de adubação. Outras variações não foram comprovadas estatisticamente. Não houve variações significativas no conteúdo de clorofila *b* nas plantas de *E. leiocarpa* (Figura 10, Tabela 10).

As concentrações de carotenoides também não foram alteradas significativamente em plantas de *C. floribundus* expostas ao excesso de N no solo, ao aumento de temperatura e nem ao longo das semanas do experimento. No caso de *E. leiocarpa*, a adubação com excesso de N promoveu um aumento dos teores foliares de carotenoides somente aos 28 dias do experimento, tanto sob regime de T atual quanto T alta. Outras tendências não foram comprovadas estatisticamente (Figura 10, Tabela 11).

Croton floribundus



Esenbeckia leiocarpa

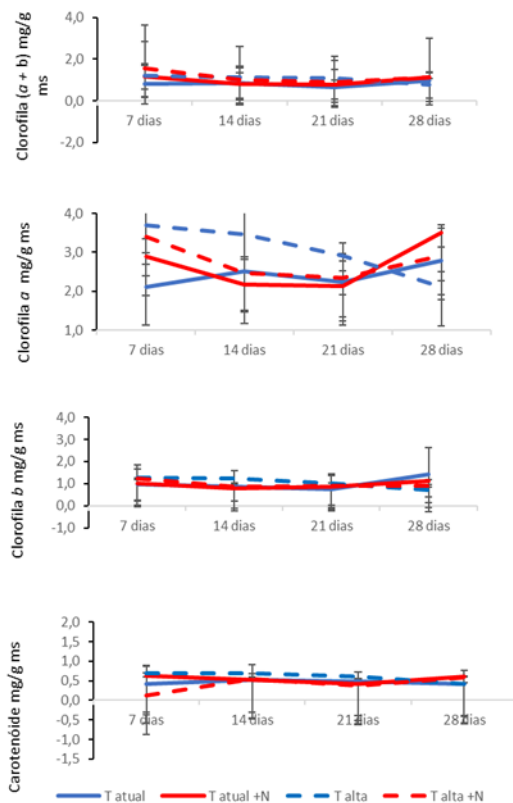


Figura. 10: Concentrações médias de clorofilas a, b, total (a+b) e carotenoides em folhas de *Croton floribundus* e *Esenbeckia leiocarpa* ao longo dos 28 dias de experimento. T atual (plantas submetidas ao termoperíodo de 26°C dia/19°C noite e adubadas com solução balanceada); T atual + N (plantas submetidas ao termoperíodo de 26°C dia/19°C noite e adubadas com solução balanceada+adição de N); T alta (plantas submetidas ao termoperíodo de 32°C dia/20°C e adubadas com solução balanceada); T alta + N (plantas submetidas ao termoperíodo de 32°C dia/20°C noite e adubadas com solução balanceada+adição de N).

Tabela 8: Valores médios da concentração de clorofila total em folhas de *Croton floribundus* e *Esenbeckia leiocarpa* ao longo de 28 dias de experimento e valores de p resultantes da ANOVA fatorial (Fator 1: regime de temperatura; fator 2: adubação; fator 3: tempo). Letras minúsculas distintas indicam diferenças entre tempos de amostragem dentro de cada tratamento de adubação e de temperatura. Médias destacadas em negrito indicam efeito significativo da adubação (Bal. vs +N) em cada tratamento de temperatura e em cada tempo de amostragem. * Indica efeito de temperatura (T atual vs T alta) em cada tratamento de adubação e cada tempo de amostragem. Somente diferenças significativas foram destacadas.

Tempo de amostragem (dias)	<i>Croton floribundus</i>				<i>Esenbeckia leiocarpa</i>			
	T atual		T alta		T atual		T alta	
	Bal.	+N	Bal.	+N	Bal.	+N	Bal.	+N
7	8,7 b	8,8	11,1	12,0	3,1	3,9	5,0 *	4,6 *
14	11,1 b	8,7	9,1	9,7	3,4	2,9	4,7	3,3
21	8,8 ab	10,2	13,5	17,0	3,0	3,0	3,9	3,3
28	11,6 a	15,0	9,1	19,4	4,2	4,6	2,8	3,8
ANOVA		p			ANOVA		p	
Fator 1		0,223			Fator 1		0,132	
Fator 2		0,222			Fator 2		0,800	
Fator 3		0,194			Fator 3		0,160	
Interações					Interações			
1 x 2		0,517			1 x 2		0,311	
1 x 3		0,032			1 x 3		0,018	
2 x 3		0,513			2 x 3		0,193	
1 x 2 x 3		0,938			1 x 2 x 3		0,708	

T atual: Plantas submetidas ao termoperíodo diário de 26°C dia/19°C noite; **T alta:** Plantas submetidas ao termoperíodo de 32°C dia/20°C noite; **Bal.:** Plantas adubadas com solução nutritiva balanceada; **+N:** plantas adubadas com solução nutritiva balanceada e acrescida do dobro da concentração de N.

Tabela 9: Valores médios da concentração de clorofila *a* em folhas de *Croton floribundus* e *Esenbeckia leiocarpa* ao longo de 28 dias de experimento e valores de p resultantes da ANOVA fatorial (Fator 1: regime de temperatura; fator 2: adubação; fator 3: tempo). Letras minúsculas distintas indicam diferenças entre tempos de amostragem dentro de cada tratamento de adubação e de temperatura. Médias destacadas em negrito indicam efeito significativo da adubação (Bal. vs +N) em cada tratamento de temperatura e em cada tempo de amostragem. * Indica efeito de temperatura (T atual vs T alta) em cada tratamento de adubação e cada tempo de amostragem. Somente diferenças significativas foram destacadas.

Tempo de amostragem (dias)	<i>Croton floribundus</i>				<i>Esenbeckia leiocarpa</i>			
	T atual		T alta		T atual		T alta	
	Bal.	+N	Bal.	+N	Bal.	+N	Bal.	+N
7	6,6 b	6,6	7,9	8,8	2,1	2,9	3,7 a	3,4
14	8,1 b	6,4	6,8	7,1	2,5	2,2	3,5 ab	2,5
21	6,5 ab	7,4	9,5	12,0	2,2	2,1	2,9 ab	2,3
28	8,2 a	10,3	6,3	13,8	2,8	3,5	2,1 b	2,9
ANOVA		p			ANOVA		p	
Fator 1		0,079			Fator 1		0,049	
Fator 2		0,324			Fator 2		0,988	
Fator 3		0,287			Fator 3		0,124	
Interações					Interações			
1 x 2		0,138			1 x 2		0,160	
1 x 3		0,047			1 x 3		0,016	
2 x 3		0,487			2 x 3		0,043	
1 x 2 x 3		0,937			1 x 2 x 3		0,752	

T atual: Plantas submetidas ao termoperíodo diário de 26°C dia/19°C noite; **T alta:** Plantas submetidas ao termoperíodo de 32°C dia/20°C noite; **Bal.:** Plantas adubadas com solução nutritiva balanceada; **+N:** plantas adubadas com solução nutritiva balanceada e acrescida do dobro da concentração de N.

Tabela 10: Valores médios da concentração de clorofila *b* em folhas de *Croton floribundus* e *Esenbeckia leiocarpa* ao longo de 28 dias de experimento e valores de *p* resultantes da ANOVA fatorial (Fator 1: regime de temperatura; fator 2: adubação; fator 3: tempo). Letras minúsculas distintas indicam diferenças entre tempos de amostragem dentro de cada tratamento de adubação e de temperatura. Médias destacadas em negrito indicam efeito significativo da adubação (Bal. vs +N) em cada tratamento de temperatura e em cada tempo de amostragem. * Indica efeito de temperatura (T atual vs T alta) em cada tratamento de adubação e cada tempo de amostragem. Somente diferenças significativas foram destacadas.

Tempo de amostragem (dias)	<i>Croton floribundus</i>				<i>Esenbeckia leiocarpa</i>			
	T atual		T alta		T atual		T alta	
	Bal.	+N	Bal.	+N	Bal.	+N	Bal.	+N
7	2,1 b	2,2 ab	3,2	3,2	1,0	1,0	1,3	1,2
14	3,0 b	2,3 ab	2,3	2,5	0,9	0,8	1,2	0,9
21	2,3 ab	2,8 b	3,9	5,0	0,8	0,8	1,0	0,9
28	3,4 a	4,6 a	2,7	5,6	1,4	1,1	0,7	0,9
	ANOVA	p			ANOVA	p		
	Fator 1	0,136			Fator 1	0,675		
	Fator 2	0,171			Fator 2	0,537		
	Fator 3	0,023			Fator 3	0,420		
	Interações				Interações			
	1 x 2	0,687			1 x 2	0,889		
	1 x 3	0,008			1 x 3	0,074		
	2 x 3	0,411			2 x 3	0,868		
	1 x 2 x 3	0,815			1 x 2 x 3	0,632		

T atual: Plantas submetidas ao termoperíodo diário de 26°C dia/19°C noite; **T alta:** Plantas submetidas ao termoperíodo de 32°C dia/20°C noite; **Bal.:** Plantas adubadas com solução nutritiva balanceada; **+N:** plantas adubadas com solução nutritiva balanceada e acrescida do dobro da concentração de N.

Tabela 11: Valores médios da concentração de carotenoides em folhas de *Croton floribundus* e *Esenbeckia leiocarpa* ao longo de 28 dias de experimento e valores de *p* resultantes da ANOVA fatorial (Fator 1: regime de temperatura; fator 2: adubação; fator 3: tempo). Letras minúsculas distintas indicam diferenças entre tempos de amostragem dentro de cada tratamento de adubação e de temperatura. Médias destacadas em negrito indicam efeito significativo da adubação (Bal. vs +N) em cada tratamento de temperatura e em cada tempo de amostragem. * Indica efeito de temperatura (T atual vs T alta) em cada tratamento de adubação e cada tempo de amostragem. Somente diferenças significativas foram.

Tempo de amostragem (dias)	<i>Croton floribundus</i>				<i>Esenbeckia leiocarpa</i>			
	T atual		T alta		T atual		T alta	
	Bal.	+N	Bal.	+N	Bal.	+N	Bal.	+N
7	1,1	1,0	1,0	1,2	0,4	0,6	0,7	0,1
14	1,1	1,0	1,2	1,3	0,5	0,5	0,7	0,5
21	0,9	1,2	1,4	1,7	0,5	0,4	0,6	0,4
28	1,1	1,3	0,9	2,0	0,4	0,6	0,4	0,6
	ANOVA	p			ANOVA	p		
	Fator 1	0,354			Fator 1	0,117		
	Fator 2	0,316			Fator 2	0,823		
	Fator 3	0,628			Fator 3	0,126		
	Interações				Interações			
	1 x 2	0,626			1 x 2	0,011		
	1 x 3	0,273			1 x 3	0,601		
	2 x 3	0,630			2 x 3	0,008		
	1 x 2 x 3	0,948			1 x 2 x 3	0,294		

T atual: Plantas submetidas ao termoperíodo diário de 26°C dia/19°C noite; **T alta:** Plantas submetidas ao termoperíodo de 32°C dia/20°C noite; **Bal.:** Plantas adubadas com solução nutritiva balanceada; **+N:** plantas adubadas com solução nutritiva balanceada e acrescida do dobro da concentração de N.

5.5. Curvas de crescimento

O número de folhas tendeu a aumentar ao longo dos 28 dias de experimento nas plantas de *C. floribundus* expostas aos 4 tratamentos, mas o crescimento em altura foi menos evidente ao longo do tempo (Figura 11). As plantas de *C. floribundus* cresceram, em média no intervalo de 28 dias do experimento, 2,2 cm, 1,3 cm, 3,7 cm e 2,7 cm em altura e produziram mais 5, 6, 6 e 8 novas folhas, quando expostas respectivamente aos tratamentos T atual/Bal., T atual/+N, T alta/Bal. e T alta/+N. Apesar de haver a tendência de aceleração do crescimento em altura e número de folhas das plantas em resposta à adubação com excesso de N e/ou elevação da temperatura, a ANOVA não demonstrou haver diferenças significativas entre os tratamentos.

Por outro lado, o crescimento de plantas de *E. leiocarpa* ao longo do experimento pareceu ser mais afetado pela combinação de estressores (Figura 11). As plantas cresceram, em média no intervalo de 28 dias do experimento, 0,4 cm, 1,2 cm e 0,2 cm em altura e produziram mais 1, 1 e 2 novas folhas, quando expostas respectivamente aos tratamentos T atual/Bal., T atual/+N e T alta/Bal. No tratamento T alta/+N, as plantas cresceram 2,2 cm e perderam 4 folhas em média, no intervalo de 28 dias. A ANOVA não paramétrica comprovou haver redução significativa do número de folhas de plantas expostas à ação combinada do excesso de N no solo e temperatura elevada do ar.

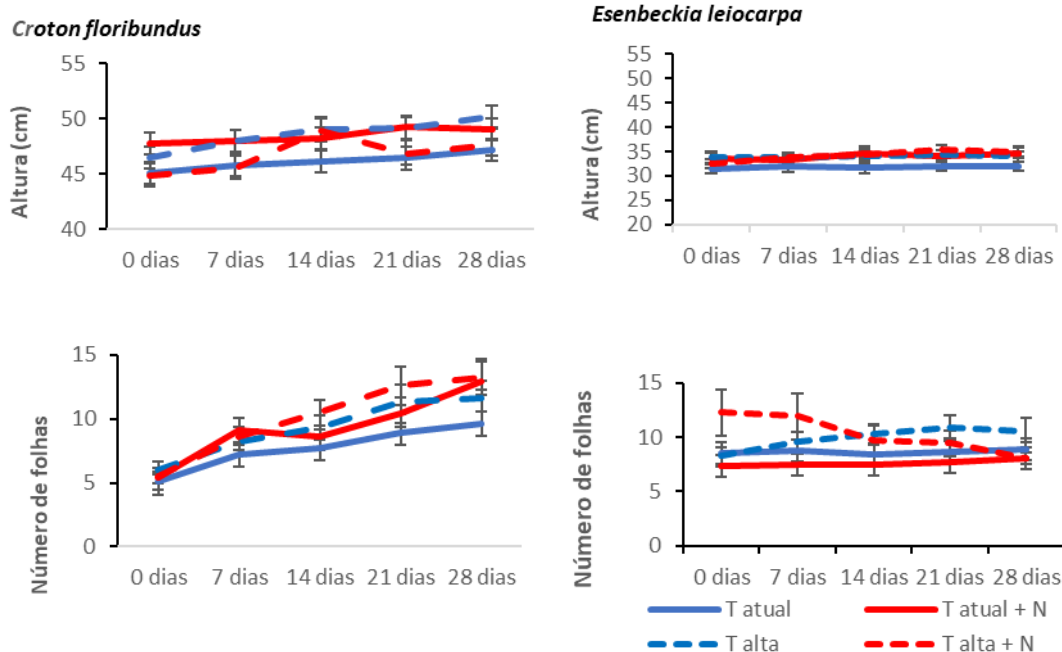


Figura 11:Curvas de crescimento em número de folhas e altura de *Croton floribundus* e *Esenbeckia leiocarpa* ao longo dos 28 dias de experimento. T atual (plantas submetidas ao termoperíodo de 26°C dia/19°C noite e adubadas com solução balanceada); T atual + N (plantas submetidas ao termoperíodo de 26°C dia/19°C noite e adubadas com solução balanceada+adição de N); T alta (plantas submetidas ao termoperíodo de 32°C dia/20°C e adubadas com solução balanceada); T alta + N (plantas submetidas ao termoperíodo de 32°C dia/20°C noite e adubadas com solução balanceada+adição de N).

6. DISCUSSÃO

O solo do remanescente florestal do Parque Estadual Fontes do Ipiranga (PEFI), utilizado em ambos os experimentos, possuía boa fertilidade no início do experimento [Capacidade de troca catiônica (CTC) = 180 mmol dm^{-3} ; soma de bases trocáveis (SB) = 153 mmol dm^{-3}]. No final dos dois experimentos, esses atributos de fertilidade foram reduzidos (redução em média de 38% na CTC e 47% na SB), mesmo considerando que houve aplicação de soluções nutritivas balanceadas ou balanceadas com o dobro da concentração de N. Essa redução indica que as plantas de ambas as espécies, ao absorverem cátions, interferiram na fertilidade do solo. Além disso, esse resultado, associado a maior taxa de NO_3^- em relação a NH_4^+ no solo, indica que o solo possui boa capacidade para realizar as trocas catiônicas, proporcionando maior adsorção de cátions como NH_4^+ e menor adsorção de ânions como NO_3^- . Solos que apresentam alta capacidade na troca de cátions tende a ter maiores reservas de nutrientes minerais (Zhan et al 2015; Liu et al, 2020).

Os níveis de N-NH_4^+ no solo foram afetados pelo excesso de adubação nitrogenada, porém de forma inversa nos dois experimentos realizados. Enquanto os níveis foram aumentados no experimento com *C. floribundus*, estes foram reduzidos no experimento com *E. leiocarpa*. Já as concentrações de N-NO_3^- foram afetadas não só pelo excesso de adubação nitrogenada como pela elevação da temperatura do ar. As alterações nos níveis de N-NO_3^- causadas pela elevação da temperatura foram novamente contrastantes nos dois experimentos. O aumento da temperatura promoveu a redução dos níveis desse íon no solo utilizado no cultivo de *C. floribundus* e aumento no utilizado no cultivo de *E. leiocarpa*. Segundo Heinzle et al. (2021), o aquecimento da atmosfera afeta o ciclo de nitrogênio (N) em solos florestais, mas as implicações para a disponibilidade de N para as plantas permanecem incertas. Esses autores mostraram que a abundância das diferentes

formas de N no solo não foi afetada em resposta ao aquecimento do solo de uma floresta de clima temperado, contrastando com os resultados obtidos neste estudo. Porém, Hu et al. (2020) demonstraram que a deposição de NH_4^+ no solo pode promover o aumento das emissões de gases intensificadores do efeito estufa, resultando no aquecimento do ar, ocorrendo o inverso em resposta à deposição de NO_3^- .

As proporções entre as concentrações de N- NH_4^+ e N- NO_3^- também foram mais alteradas pela elevação da temperatura e adubação com excesso de N no experimento com *E. leiocarpa* do que no realizado com *C. floribundus*. A razão N- NH_4^+ /N- NO_3^- no solo utilizado para cultivo de plantas de *C. floribundus* foi apenas alterada ao longo do tempo. No solo de cultivo de *E. leiocarpa*, essa razão foi mais alta sob termoperíodo atual e após fertilização com solução nutritiva balanceada e observou-se redução significativa ao longo do tempo, especialmente sob temperatura alta.

Esses resultados contrastantes indicam que o crescimento de *C. floribundus* ou *E. leiocarpa* pareceram afetar de forma distinta os níveis de N- NH_4^+ e N- NO_3^- no solo ao longo dos 28 dias de experimento. Possivelmente, essa interferência resultou das estratégias distintas de aproveitamento dos compostos nitrogenados presentes no solo.

Embora a quantidade de NO_3^- seja maior que a de NH_4^+ em ambas as espécies, *C. floribundus* pareceu acumular mais NH_4^+ nas folhas em relação a *E. leiocarpa*. Além disso, a espécie não pioneira *E. leiocarpa* metabolizou mais rapidamente o NH_4^+ e menos NO_3^- . O contrário foi observado em *C. floribundus*. Essa estratégia de aproveitamento do NH_4^+ pela *E. leiocarpa* também pode ter resultado em economia de energia, pois a assimilação de NO_3^- requer a transferência de 2 elétrons por NO_3^- convertido em NO_2^- , 6 elétrons por NO_2^- convertido em NH_4^+ e 2 elétrons e 1 ATP por molécula de NH_4^+ convertida em glutamato. Dessa forma, a assimilação do NO_3^- demanda mais energia, em comparação à assimilação do NH_4^+ . Portanto, a diferença na taxa de absorção de íons

nutrientes nas plantas indica que as espécies *C. floribundus* e *E. leiocarpa* removem cátions e ânions em quantidades desiguais do meio (Crawford 1995, 2007; Sinha et al 2020).

A atividade enzimática de ambas as espécies também evidenciou estratégias distintas para o uso do nitrogênio em excesso, que apontam para os estágios sucessionais aos quais pertencem, como ressaltado por Aidar et al. (2003) e Debiasi et al. (2019, 2021). A espécie pioneira *C. floribundus* teve atividade de nitrato redutase (NR) mais vulnerável à ação dos fatores de estresse testados do que a da espécie não pioneira *E. leiocarpa*, mostrando grande afinidade por NO_3^- , apesar da necessidade de investimento de energia. A atividade da glutamina sintetase (GS) é menor em *C. floribundus*, explicando porque NH_4^+ é acumulado nas folhas. A espécie não pioneira *E. leiocarpa* apresentou (baixa)atividade da enzima NR e alta atividade da enzima GS, e baixa taxa de absorção de NO_3^- e NH_4^+ , indicando que a espécie mantém controle no gasto de energia ao absorver mais NH_4^+ do que NO_3^- e rápida metabolização em aminoácidos pela enzima GS.

De acordo com Debiasi et al. (2019, 2021), a luz é um fator de indução para o funcionamento das enzimas NR e GS, e é contrastante entre espécies de estágios sucessionais diferentes da Floresta Atlântica. Espécies não pioneiras tenderam a ter menor atividade de NR e maior atividade de GS. O inverso foi mostrado para as espécies pioneiras, que são tolerantes à luz, apresentam maior atividade fotossintética e maior disponibilidade energética para NO_3^- . Nesses estudos, houve espécies que apresentaram estratégias intermediárias, apontando que o uso eficiente de N associado a intensidade luminosa é dependente das características ecológicas da espécie.

Plantas adotam estratégias, ou sistemas para modular sua capacidade de absorção via raízes para lidar com as alterações no solo quanto ao nível de disponibilidade de

nitrogênio (referências). A obtenção de NH_4^+ e NO_3^- do solo pelas raízes da planta são mediados por transportadores de amônio (AMTs) e nitrato (NRTs), que diferem em quantidade e afinidade (HATS e LATS) de uma planta a outra, sugerindo que algumas plantas têm maior alternância e estímulo dos transportadores de alta e baixa afinidade (HATS e LATS) para amônio (AMTs) e pouca para nitrato (NRTs), ou o inverso. Portanto, a espécie não pioneira *E. leiocarpa*, como tende a absorver mais NH_4^+ e menos NO_3^- , pode ter mais HATS e LATS para transportadores de amônio (AMTs) e menos para transportadores de nitrato (NRTs). Já a espécie pioneira *C. floribundus* tende ao inverso, podendo ter maior alternância e estímulo HATS e LATS para transportadores de nitrato (NRTs) e menos para transportadores de amônio (AMTs) (Fan et al., 2017; Sinha et al., 2020; Mubasher et al., 2020; Shahidul et al., 2020).

Culturas agrícolas que preferem NH_4^+ podem exsudar para o solo inibidores de nitrificação biológica, que resultam na retenção de nitrogênio na forma de NH_4^+ , já o trigo, com preferência por NO_3^- , é capaz de diminuir ativamente a razão $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ no solo (He et al. 2022). É possível que as espécies do presente estudo apresentem tais características, apesar de se conhecer muito pouco a respeito para espécies arbóreas.

Essas estratégias diferentes entre as espécies podem também ser explicadas por processos de aclimação a mudanças na fertilidade do solo ao longo da sucessão ecológica *C. floribundus*, por ser pioneira, estaria apta a crescer em solo menos fértil, dessa forma fazendo menos trocas catiônicas na superfície da partícula do solo, o que facilitaria a absorção de ânions como o NO_3^- . A espécie não pioneira por se encontrar em estágio sucessional mais avançado, cresceria em solo com maior fertilidade e maior capacidade de troca catiônica, favorecendo, então, a absorção de NH_4^+ da superfície das partículas do solo.

Em geral, espera-se encontrar em espécies pioneiras maior taxa fotossintética, maior acúmulo de biomassa, e menor concentração de clorofilas e carotenoides. Entretanto, espécies pioneiras necessitam de maior proteção antioxidante para reparar os danos oxidativos causados pela alta luminosidade (Brandão et al 2017, Esposito et al. 2018). A concentração de clorofila total, clorofila a e b, e carotenoides tendeu a ser maior em *C. floribundus* do que em *E. leiocarpa*, indicando que a espécie *C. floribundus* possivelmente tem maior taxa fotossintética se comparado a *E. leiocarpa*. É possível que o fato da espécie *C. floribundus* ter estocado mais NH_4^+ do que a *E. leiocarpa* pode ter causado estresse oxidativo, e para reparar o dano investiu no sistema de defesa antioxidante, como a produção de clorofilas e carotenoides. Estes são pigmentos envolvidos no sistema de defesa antioxidante; as clorofilas atuam na proteção das membranas, e os carotenoides podem eliminar o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), podem reagir diretamente com o ânion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot -}$) e outros radicais livres, e podem prevenir a peroxidação lipídica (Gill & Tuteja 2010; González et al 2012; Brandão et al 2017, Esposito et al. 2018).

A ausência de alterações no crescimento indica que *C. floribundus* é capaz de tolerar a elevação de temperatura e/ou excesso de N. O crescimento de *E. leiocarpa*, por sua vez, pareceu ser mais afetado pela ação combinada desses estressores ambientais, que devem ter causado estresse oxidativo, resultando na queda significativa de folhas. A senescência acelerada e a queda de folhas têm sido observadas em resposta ao estresse oxidativo induzido por ozônio (Fernandes et al.2019).

7. CONCLUSÕES

O crescimento de *C. floribundus* e *E. leiocarpa* afetou de forma distinta os níveis de NH_4^+ e NO_3^- no solo ao longo dos 28 dias de experimento. As concentrações de N-NH_4^+ no solo foram alteradas apenas em função do tipo de adubação nitrogenada das plantas. No entanto, no experimento com *C. floribundus*, o solo que recebeu solução nutritiva com excesso de N continha mais N-NH_4^+ . O inverso ocorreu no experimento com *E. leiocarpa*. A temperatura do ar afetou os níveis de N-NO_3^- no solo de cultivo de *C. floribundus* e estes foram reduzidos ao longo do tempo em todos os tratamentos. Já a elevação da temperatura do ar causou um aumento dos níveis de N-NO_3^- no solo de cultivo de *E. leiocarpa* ao longo do experimento. A razão das concentrações de N-NH_4^+ e de N-NO_3^- no solo foi apenas reduzida ao longo do tempo no experimento com *C. floribundus*. No experimento com *E. leiocarpa*, além de ser reduzida ao longo do experimento, essa razão foi mais alta sob termoperíodo atual e após fertilização com solução nutritiva balanceada.

Essas relações solo-planta contrastantes resultaram possivelmente das estratégias distintas de aproveitamento dos compostos nitrogenados presentes no solo por ambas as espécies, quando expostas ao excesso de N no solo e/ou temperaturas elevadas no solo. Enquanto em plantas de *C. floribundus*, os níveis foliares e radiculares de NH_4^+ foram reduzidos pela adubação em excesso de N, nas de *E. leiocarpa* o NH_4^+ foi detectado até 14 dias experimento. Nas raízes de *E. leiocarpa* foi comprovado aumento significativo dos teores de NH_4^+ aos 28 dias.

Os níveis de NO_3^- variaram ao longo do tempo em ambas as espécies, tanto nas raízes quanto nas folhas. Mas, a alta temperatura teve papel importante para o aumento da NR em folhas de *C. floribundus* e a atividade da NR nas folhas dessa espécie decresceu ao longo tempo. A atividade da NR para *E. leiocarpa* não respondeu ao tipo de temperatura, mas sim para ao tipo de adubação, havendo pico de atividade da enzima aos 14 dias sob o

regime de temperatura atual com adubação balanceada. Nas raízes também houve redução da atividade da NR ao longo do tempo. A atividade da GS em folhas e raízes de *C. floribundus* não variou em função do regime de temperatura, adubação e tempo. Por outro lado, a GS nas folhas e raízes de *E. leiocarpa* variaram significativamente em função do tempo, nas plantas expostas aos dois regimes de temperatura e adubação com N.

Houve pouca evidência de ocorrência de danos fisiológicos causados pelo excesso de e/ou elevação de temperatura em *C. floribundus*. Porém, para *E. leiocarpa* o conteúdo de carotenoides aumentou no tratamento com excesso de N aos 28 dias de experimento. Além disso, houve redução significativa do número de folhas de plantas de *E. leiocarpa* expostas à ação combinada do excesso de N no solo e temperatura elevada do ar.

Em um cenário de mudanças climáticas e alta deposição de nitrogênio, há indícios de que a espécie *E. leiocarpa* seja mais suscetível a esses efeitos, visto que apresentou redução no número de folhas e aumento de pigmentos característicos do estresse oxidativo. E a pioneira *C. floribundus* demonstrou estratégias eficientes no uso do N e tolerância ao estresse climático, podendo ser indicada para trabalhos de restauração.

8. BIBLIOGRAFIA

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 Environ* 26:389–399.

Bobbink R.; Hicks K.; Galloway J.; Spranger T. A.; R Ashmore M.; Bustamante M.; Cinderby S.; & Davidson, Eric & Dentener, Frank & Emmett, B. & Erisman, Jan Willem & Fenn, M.; Gilliam F.; Nordin, A.; Pardo L.; Vries W.; 2010. Global assessment of nitrogen deposition effects on terrestrial plant diversity: a synthesis. *Ecological Applications*. 20. 30-59.

Boccuzzi G.; Nakazato R. K.; Pereira M. A. G.; Rinaldi M. C. S.; Lopes M. I. M. S.; Domingos, M. 2020. Nitrogen and phosphorus dynamics at the atmosphere-tree vegetation- litter-soil interface in remnants of Atlantic Forest, SE Brazil. Submetido a *Plant and Soil*.

Brandão S. E.; Bulbovas P.; Lima M. E. L.; Domingos M. 2017. Biochemical leaf traits as indicators of tolerance potential in tree species from the Brazilian Atlantic Forest against oxidative environmental stressors. *Science of the Total Environment*, v. 575, p. 406-417.

Bredemeier C.; Mundstock C.. 2000. Regulação da absorção e assimilação do nitrogênio nas plantas. *Ciência Rural - CIENC RURAL*. 30. 10.1590/S0103-84782000000200029.

Cammaerts D.; Jacobs M. 1985. A study of the role of glutamate dehydrogenase in the nitrogen metabolism of *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 163: 517-526.

Carreras H.A.; Pignata M. L. 2001. Comparison among air pollutants, meteorological conditions, and some chemical parameters in the transplanted lichen *Usnea amblyoclada*. *Environmental Pollution* 111: 45-52.

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 of Soil Science and Plant Annals* 6:71- 80.

Cotrozzi L.; Remorini D.; Pellegrini E.; Landi M.; Massai R.; Nali C.; Lorenzini G. (2016). Variations in physiological and biochemical traits of oak seedlings grown under drought and ozone stress. *Physiologia Plantarum*, 157(1), 69–84. doi:10.1111/ppl.12402.

Cui L.; Cao R.; Li J.; Zhang L.; Wang J. 2006. High-temperature effects on ammonium assimilation in leaves of two *Festuca arundinacea* cultivars with different heat susceptibility. *Plant Growth Regul* (2006) 49:127–136.

Cheng Y.; Wang J.; Chan S. X.; Cai Z.; Müller C.; Zhang J. 2019. Nitrogen deposition affects both net and gross soil nitrogen transformations in forest ecosystems: A review. *Environmental Pollution* 244 608e616.

Crawford N. M. 1995. Nitrate: nutrient and signal for plant growth. *The Plant Cell* 7: 859- 868.

Crawford N.M. 2007. Nitrate: nutrient and signal for plant growth. *Plant Cell* 7, 859–868. <https://doi.org/10.2307/3870042>.

Debiasi T.V, Calzavara, A.K; Silva L.M.I.; Bianchini E.; Pimenta J. A.; Stolf M. R.; Aida M. P. M.; Sodek L.; Oliveira H. C. 2019. Metabolismo do nitrogênio de mudas de árvores neotropicais com características ecológicas contrastantes. *Acta Physiol Plant* 41, 131. <https://doi.org/10.1007/s11738-019-2923-9>.

Debiasi T. V; Calzavara A. K; Sodek L.; Oliveira H.C. 2021 Plasticidade do uso do nitrogênio em resposta à intensidade da luz em espécies arbóreas neotropicais de grupos funcionais distintos. *Phisiologia Plantarum* V 172, Ed 4, 2226-2237. <https://doi.org/10.1111/ppl.13470>.

Domingos M.; Bulbovas P.; Camargo C.Z.; Aguiar-Silva C.; Brandão S.E.; Dafré-Martinelli M.; Dias A.P.; Engela M.R.; Gagliano J.; Moura B.B.; Alves E.S, Rinaldi M.C.; Gomes E.P.; Furlan C.M.; Figueiredo A.M.; Searching for native tree species and respective potential biomarkers for future assessment of pollution effects on the highly diverse Atlantic Forest in SE-Brazil. *Environ Pollut.* 2015 Jul; 202:85-95. DOI: 10.1016/j.envpol.2015.03.018. Epub 2015 Mar 25. PMID: 25818087.

Epstein E. 1975. Nutrição mineral de plantas: princípios e perspectivas. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 341p

Esposito M. P.; Nakazato, R. K.; Pedroso A. N. V.; Lima M. E. L.; Figueiredo M. A.; Diniz A. P.; Kozovits A. R.; Domingos M. 2018. Oxidant-antioxidant balance and tolerance against oxidative stress in pioneer and non-pioneer tree species from the remaining Atlantic Forest. *Science of the Total Environment* 625: 382-393.

Favaretto V.F.; Martinez C.A.; Soriani H.H.; Furriel R.P.M. 2011. Differential responses of antioxidant enzymes in pioneer and late-successional tropical tree species grown under sun and shade conditions. *Environmental and Experimental Botany* 70: 20–28.

Fan T.F.; Cheng X.Y.; Shi D.X.; He M. J.; Yang C.; Liu L.; Li C.; J.; Sun Y. C.; Chen Y.Y.; Xu C.; Zhang, Lei L. L.-H. 2017 Molecular identification of tobacco NtAMT1.3 that mediated ammonium root-influx with high affinity and improved plant growth on ammonium when overexpressed in Arabidopsis and tobacco, *Plant Science*, Volume 264, 2017, Pages 102-111, ISSN 0168-9452, <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2017.09.001>.

Fernandes, Francine.; Pannia Esposito, Marisia.; Engela, Marcela.; Cardoso-Gustavson.; Poliana.; Furlan, Cláudia Maria.; Hoshika, Yasutomo.; Carrari, Elisa.; Magni, Giada.; Domingos, Marisa.; Paoletti, Elena. (2018). The passion fruit liana (*Passiflora edulis* Sims, *Passifloraceae*) is tolerant to ozone. *Science of The Total Environment*. 10.1016/j.scitotenv.2018.11.425.

Filho N. D.; Oliveira L. E. M.; Alves J. D.; Purcino A. Á. C. 1998. Redução de nitrato e assimilação de amônio em plantas jovens de hevea brasiliensis cultivadas sob níveis crescentes de nitrato. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 10(3):185-190,1998.

Gaudio N.; Belyazid S.; Gendre X.; Mansat A.; Nicolas M.; Rizzetto S.; Sverdrup H.; Probst, A. 2015. Combined effect of atmospheric nitrogen deposition and climate change on temperate forest soil biogeochemistry: A modeling approach. 2015. *Ecological Modelling* 306 24–34.

Gill SS, Tuteja N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol Biochem*. 2010 Dec;48(12):909-30. doi: 10.1016/j.plaphy.2010.08.016. Epub 2010 Sep 15. PMID: 20870416.

Gilliam F. 2021. Responses of Forest Ecosystems to Nitrogen Deposition. *Forests* 12: 1190. <https://doi.org/10.3390/f12091190>

Hansen U.; Fiedler B.; & Rank, B. 2002. Variation of pigment composition and antioxidative systems along the canopy light gradient in a mixed beech/oak forest: a comparative study on deciduous tree species differing in shade tolerance. *Trees* 16, 354–364.

He X.; Qiaodong, C; Lei M.; Chang Z.; Mengqiu H.; Xiaoqian D.; Xinqi H.; Jun Z.; Cai Z.; Jinbo Z.; Müller C. 2022 Plants with nitrate preference can regulate nitrification to meet their nitrate demand, *Soil Biology and Biochemistry*, Volume 165, 108516, ISSN 0038-0717, <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2021.108516>.

Heinze J.; Wanek W.; TianY.; Kengdo S. K; Borken W.; Schindlbacher A.; Inselsbacher E.; 2021. No effect of long-term soil warming on diffusive soil inorganic and organic nitrogen fluxes in a temperate forest soil, *Soil Biology and Biochemistry*, Volume 158, 108261, ISSN 0038-0717, <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2021.108261>.

Hata H.; Inoue K.; Lin B.L; Tsunemi K. 2022. Urban-scale analysis of nitrogen deposition in Japan: Validation of chemical transport modeling and the sensitivity of anthropogenic nitrogen emissions to dry and wet depositions, *Atmospheric Environment*, Volume 275, 2022, 119022, ISSN 1352-2310, <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2022.119022>

Huang W. J.; Zhou G. Y.; Liu J. X. 2012. Nitrogen and phosphorus status and their influence on aboveground production under increasing nitrogen deposition in three successional forests. *Acta Oecologica* 44: 20-27.

Hu Y.; Li C.; Jiang L.; Liang D.; Zhao X. 2020. Growth performance and nitrogen allocation within leaves of two poplar clones after exponential and conventional nitrogen applications, *Plant Physiology and Biochemistry*, Volume 154, Pages 530-537, ISSN 0981-9428, <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.06.053>.

IAG/USP. 2014. Boletim Meteorológico do ano de 2013. Estação Meteorológica do IAG/USP. Seção Técnica de Serviços Meteorológicos.

IPCC. 2007. Climate Change 2007: Synthesis Report. Summary for Policymakers. WG1, AR4. (<http://ipcc-wg1.ucar.edu/wg1/wg1-report.html>).

IPCC, 2007: Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change [Solomon, S., D. Qin, M. Manning, Z. Chen, M. Marquis, K.B. Averyt, M. Tignor and H.L. Miller (eds.)]. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA, 996 pp.

Itoh Y.; Masahiro K.; Toru O.; Akihiro I.; Yoshimi S.; Shuichiro Y. 2021. Influence of chronic and excessive nitrogen influx on forest ecosystems connected to the Tokyo metropolitan area, *Ecological Indicators*, Volume 127, 2021, 107771, ISSN 1470-160X, <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2021.107771>.

Jaworski E. G. 1971. Nitrate reductase assay in intact plant tissues. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 43:1274-1279.

Johnson D. W.; Turner J. 2014. Nitrogen budgets of forest ecosystems: A review. *Forest Ecology and Management* 318 370-379.

Kuznetsov V.V.; Rakitin V.Y.; Zholkevich V.N. 1999. Effects of preliminary heat-shock treatment on accumulation of osmolytes and drought resistance in cotton plants during water deficiency. *Physiol Plant* 107:399–406.

Liu N.; Wu S.; Guo Q.; Wang J.; Cao Ce.; Wang J. 2018 Leaf nitrogen assimilation and partitioning differ among subtropical forest plants in response to canopy addition of nitrogen treatments, *Science of The Total Environment*, Volumes 637–638, Pages 1026-1034, ISSN 0048-9697, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.05.060>.

Liu J.; Zilong W.; Feinan H.; Chenyang X.; Rentian M.; Shiwei Z., 2020. Soil organic matter and silt contents determine soil particle surface electrochemical properties across a long-term natural restoration grassland. *Catena* 190 (2020) 104526.

Luminati O.; Ledebur B. A. C.; Flückiger B.; Brentani A.; Rösli M.; Hoogh G. F. K. Land use regression modelling of NO₂ in São Paulo, Brazil, *Environmental Pollution*, Volume 289, 2021, 117832, ISSN 0269-7491, <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117832>.

Martinelli M. D.; Figueiredo A. M. G.; Domingos M. 2020. Trace element leaf accumulation in native trees from the remaining Semideciduous Atlantic Forest in Brazil, *Atmospheric Pollution Research*, Volume 11, Issue 5, Pages 871-879, ISSN 1309-1042, <https://doi.org/10.1016/j.apr.2020.01.015>.

Mccullough H. 1967. The determination of ammonia in whole blood by a direct colorimetric method. *Clinica Chimica Acta* 17: 297-304.

Mubasher R.; Soumen B.; Malay B.; Alexander B. M.; Gui-Quan S.; Bai-Lian L.; Adnan S.; Amit C. 2020 Feedforward Control of Plant Nitrate Transporter NRT1.1

Biphasic Adaptive Activity. Biophysical Journal, Volume 118, Issue 4, 2020, Pages 898-908, ISSN 0006-3495, <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2019.10.018>.

Nascimento, G.M.C. 2019. Atividade das enzimas Glutamina Sintetase e Glutamato Desidrogenase em plantas de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms submetidas à diferentes temperaturas. 57f. Tese (mestrado em biodiversidade vegetal e meio ambiente) Instituto de Botânica. São Paulo.

Palatnik J.F; Carrillo N.; Valle E.M. 1999. The role of photosynthetic electron transport in the oxidative degradation of chloroplastic glutamine synthetase. Plant Physiol 121:471–478.

Payne R. J.; Campbell C.; Britton A. J.; Mitchell R. J.; Pakeman R. J.; Jones L.; Ross L. C.; Stevens C. J.; Field C.; Caporn S. J.M.; Carroll J.; Edmondson J. L.; Carnell E.; J., Tomlinson S.; Dore A. J.; Dise N.; Dragosits U. 2019. What is the most ecologically-meaningful metric of nitrogen deposition? Environmental Pollution, Volume 247, 2019, Pages 319-331, ISSN 0269-7491, <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.01.059>.

Pignata M. L.; González C. M.; Wannaz E. D.; Carreras H. A.; Gudino G. L. 2002. Biomonitoring of air quality employing in situ *Ramalina celastri* in Argentina. International Journal of Environmental Pollution 22: 409 – 429.

Pirani, J.R., Groppo, M. Rutaceae in Flora do Brasil 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. (<https://floradobrasil2020.jbrj.gov.br/FB601>).

Pornon A.; Boutin M.; Lamaze T. 2019. Contribution of plant species to the high N retention capacity of a subalpine meadow undergoing elevated N deposition and warming. Environmental Pollution 245 235-242.

Právělie R. M. 2018. Perturbations in the Earth's forest ecosystems. Possible implications for global warming, Earth-Science Reviews, Volume 185, 2018, Pages 544-571, ISSN 0012-8252, <https://doi.org/10.1016/j.earscirev.2018.06.010>.

Rizzetto S.; Belyazid S.; Gegout J. C.; Nicolas M.; Alard D.; Corcket E.; Gaudio N.; Sverdrup H.; Probst A. 2016. Modeling the impact of climate change and atmospheric N deposition on French forests biodiversity. Environmental Pollution 213 1016 1027.

Rodrigues R. A. R.; Mello W. Z.; Souza P. A. 2007. Aporte atmosférico de amônio, nitrato e sulfato em área de floresta ombrófila densa montana na serra dos órgãos, RJ. Química Nova, Vol. 30 N°8, 1842-1848.

Ruan L.; Wang L.; Wei K.; Cheng H.; Li H.; Shao S.; Wu L. 2019. Comparative analysis of nitrogen spatial heterogeneity responses in low nitrogen susceptible and tolerant tea plants (*Camellia sinensis*), Scientia Horticulturae, Volume 246, Pages 182-189, ISSN 0304-4238, <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.10.063>.

Santos, R.F. 2016. Diversidade e Biogeografia das espécies arbóreas da tribo Crotonae (Euphorbiaceae) na Floresta Atlântica. Universidade Federal de São Paulo campus Diadema, Diadema. 174pp.

Silva F.C (Ed.). 2009. Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes. 2. ed. Embrapa Informação Tecnológica, Brasília, 627p.

Silva D.F.; Andrade C.L.T.; Simeone M.L.F.; Amaral T.A.; Castro L.A.; Moura B.F. 2010. Análise de nitrato e amônio em solo e água. Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, 55 p. (Documentos 114).

Sinha S. K.; Kumar A.; Tyagi A.; Venkatesh K.; Paul D.; Singh N. K.; Mandal P. K.; 2020. Root architecture traits variation and nitrate-influx responses in diverse wheat genotypes under different external nitrogen concentrations, Plant Physiology and Biochemistry, Volume 148, Pages 246-259, ISSN 0981-9428, <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.01.018>.

Souza P.A.; González A. G. P.; Mello W. Z.; Weathers K. C.; Santos I.A. 2020. Atmospheric organic and inorganic nitrogen inputs to coastal urban and montane Atlantic Forest sites in southeastern Brazil, Atmospheric Research, Volume 160, 2015, Pages 126-137, ISSN 0169-8095, <https://doi.org/10.1016/j.atmosres.2015.03.011>.

Shahidul I.; Jingjuan Z.; Yun Z.; Maoyun S.; Wujun M. 2020. Genetic regulation of the traits contributing to wheat nitrogen use efficiency, Plant Science, Volume 303, 110759, ISSN 0168-9452, <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2020.110759>.

Shi L.; Zhang H.; Liu T.; Mao P.; Zhang W.; Shao Y.; Fu S. 2018. An increase in precipitation exacerbates negative effects of nitrogen deposition on soil cations and soil microbial communities in a temperate forest, Environmental Pollution, Volume 235, Pages 293-301, ISSN 0269-7491, <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.12.083>.

Taiz L.; Zeiger E. 2017. Plant physiology and development, 6th Edition ISBN 9781605352558.

Van den Berg L.; Ashmore M. 2008. Nitrogen. In: SE Jørgensen & BD Fath (eds.). Encyclopedia of Ecology. Academic Press, Oxford, pp.2518-2526.

Vézima I. P.; Langlois J.R. 1989 Tissue and cellular distribution of glutamine synthetase in roots of pea (*Pisum sativum*) seedlings. Plant Physiology, 90(6):1129-1133.

Weemstra M.; Eilmann B.; Sass-Klaassen.; U.G.W.; Sterck F.J. 2013. Summer droughts limit tree growth across 10 temperate species on a productive forest site. For. Ecol. Manag. 306, 142–149.

Weatherburn M. W. 1967. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. Analytical Chemistry 39: 971-974.

Zhan, X.; Yu G.; He N.; Jia, B.; Zhou M.; Wang C.; Yan J. 2015. Inorganic nitrogen wet deposition: evidence from the north-south transect of Eastern China. Environmental Pollution, 204, 1-8.

