

Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação – MCTI
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA
Programa de Pós-graduação em Ciências de Florestas Tropicais – PPG-CFT

**CRESCIMENTO, CARACTERÍSTICAS FOTOSSINTÉTICAS E COMPOSTOS
NITROGENADOS EM PLANTAS JOVENS DE *Inga macrophylla* FERTILIZADAS
COM NITRATO E AMÔNIO**

ANA MARIA SILVA DOS SANTOS

Manaus, Amazonas

Março de 2015

ANA MARIA SILVA DOS SANTOS

**CRESCIMENTO, CARACTERÍSTICAS FOTOSSINTÉTICAS E COMPOSTOS
NITROGENADOS EM PLANTAS JOVENS DE *Inga macrophylla* FERTILIZADAS
COM NITRATO E AMÔNIO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências de Florestas Tropicais (PPG-CFT) do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências de Florestas Tropicais.

Orientador: Dr. José Francisco de Carvalho Gonçalves

Coorientador: Dr. Gilberto Costa Justino

Manaus, Amazonas

Março de 2015

S237 Santos, Ana Maria Silva dos
Crescimento, características fotossintéticas e compostos nitrogenados em plantas jovens de *Inga macrophylla* fertilizadas com nitrato e amônio / Ana Maria Silva dos Santos. --- Manaus: [s.n.], 2015.
viii, 71 f. : il. color.

Dissertação (Mestrado) --- INPA, Manaus, 2015.
Orientador : Dr. José Francisco de Carvalho Gonçalves.
Coorientador: Dr. Gilberto Costa Justino.
Área de concentração: Ciências de Florestas Tropicais.

1. Leguminosas arbóreas. 2. Trocas gasosas. 3. Ingá. I. Título.

CDD 583.32

Aos meus pais, Antonio Costa dos Santos e Anastácia Silva dos Santos

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por me conceder esta vida maravilhosa, pela saúde, por encher meu coração com muita fé e força em todos os momentos da minha vida!

Ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, lugar onde iniciei as minhas atividades na área da pesquisa e que tornou possível a realização deste estudo. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq - pela bolsa concedida.

Ao meu orientador, Dr. José Francisco pela orientação, atenção, dedicação, os ensinamentos transmitidos, os conselhos e as oportunidades.

Ao meu coorientador Dr. Gilberto Costa Justino pela atenção, paciência e ensinamentos em todos os momentos.

Ao Dr. Luiz Augusto por conceder as sementes e as estirpes de rizóbios que foram utilizadas na inoculação das plantas. Aos técnicos Manuel, Adilson e Paulino e ao estudante Augusto por todo o apoio e disposição em ajudar.

A equipe do laboratório de solos, em especial a Laura, Gabriela, Roberta e Edivaldo pela atenção durante as análises de nutrientes.

Ao professor Dr. Ladaslav Sodek (Unicamp) pelo apoio e realização da análise de aminoácidos em Campinas.

Aos meus pais por me concederem a oportunidade de estudar em Manaus, pelo apoio e amor incondicional em todos os momentos. Aos meus irmãos Adriana, André e Alice pelo carinho, preocupação e cuidados, e as minhas sobrinhas Larissa e Raíssa pelos lindos sorrisos que alegram a minha vida! Amo todos vocês!

Ao meu namorado Luís Mondêgo pelo amor, atenção, e por me compreender em todos os momentos dessa trajetória sempre com muito amor e dedicação! Agradeço de coração ao Luís Carlos, Márcia Mondêgo, Juliana Mondêgo, Diemes Dangelo, Isabela, Leonardo e Enzo por me apoiarem e fazerem minha vida mais feliz! Amo todos vocês!

Ao Dr. Ulysses Moreira, por todas as conversas esclarecedoras, pelos ensinamentos, pela confiança transmitida e palavras de conforto nos momentos de dificuldades.

A equipe do Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Vegetal do INPA, em especial, a Larissa Chevreuril, Karen Cristina, Alexandre Felipe, Aurora Maria, Ariádne Belo, Jussara Souza, Sabrina Garcia e Gleisson Nascimento por acompanhar e ajudar nas fases do experimento, pelo eficiente trabalho em equipe, as trocas de conhecimentos e experiências.

Ao amigo Vanderlei Borboni pela amizade, paciência e disponibilidade para me acompanhar nas análises.

A todos os professores do curso do Programa de Ciências de Florestas Tropicais pelos ensinamentos e dedicação.

A todos os colegas da turma do PPG-CFT 2013/2015, pela amizade, conselhos e trocas de conhecimentos durante as disciplinas.

A minha grande amiga Stephany Kudo, mais que uma amiga, uma irmã, pessoa de todas as horas, de todas as situações e pela qual tenho grande admiração e orgulho, obrigada por tudo!

Aos amigos Flávia Schimpl e Dérick Farias, pessoas que mesmo longe estão sempre comigo me apoiando e dando força.

Enfim, a todos que de maneira direta ou indireta participaram e contribuíram para que fosse possível a conclusão de mais uma etapa na minha vida **MUITO OBRIGADA!**

RESUMO

A assimilação de carbono depende, essencialmente, da capacidade das plantas em capturar e usar os recursos primários disponíveis, dentre os quais destaca-se a forma e a quantidade de nitrogênio. Espécies de leguminosas, quando em simbiose com bactérias do gênero *Rhizobium* presentes no solo, fixam o nitrogênio molecular (N_2) e passam a ter maiores teores desse nutriente. No entanto, a disponibilidade de nitrogênio mineral no solo na forma de nitrato e amônio pode reduzir o processo de fixação biológica do nitrogênio e ocasionar mudanças no transporte de compostos nitrogenados via xilema. Assim, informações que relacionam o uso das diferentes formas de nitrogênio por espécies de leguminosas são necessárias para melhor compreensão do uso do nitrogênio, do efeito sobre a fotossíntese e, por conseguinte, o crescimento e ganho de biomassa. O objetivo desta pesquisa foi investigar as respostas de crescimento, assimilação de carbono, a sensibilidade do processo de fixação biológica do nitrogênio e as possíveis alterações de compostos transportados via xilema em plantas jovens de *Inga macrophylla* noduladas e submetidas à fertilização com nitrogênio mineral (nitrato e amônio) na concentração de 5 mM. Durante 150 dias de experimentação e com intervalos regulares, as seguintes variáveis foram determinadas: taxa de crescimento relativo e absoluto em altura e diâmetro; morfologia foliar; nodulação; acúmulo e alocação de massa seca; teores foliares e radiculares de nutrientes; teores de pigmentos cloroplastídicos; fluorescência da clorofila *a*, trocas gasosas, acúmulo de nitrato, amônio e ureídeos em folhas, raízes, nódulos e seiva e o transporte de compostos nitrogenados via xilema. De modo geral, a fertilização amoniacal e nítrica promoveu as maiores taxas de crescimento absoluto e relativo em altura em relação aos demais tratamentos, enquanto que a fertilização com amônio resultou no maior acúmulo de massa seca total e investimento em área foliar total e área média foliar. Os teores foliares de nitrogênio não diferiram entre os tratamentos, indicando a contribuição do nitrogênio proveniente da fixação biológica em plantas não fertilizadas. Quanto aos aspectos fisiológicos, à fertilização com nitrato proporcionou o maior investimento em Chl *a*, Chl *b*, C_{x+c} , Chl_{total} . Não foi observada diferença entre os valores de fotossíntese, bem como para as variáveis F_v/F_m , PI_{ABS} e PI_{total} . Contudo, plantas do tratamento com amônio apresentaram limitação estomática. A fertilização com nitrato favoreceu a nodulação, enquanto que o amônio inibiu parcialmente. Em todos os tratamentos, os ureídeos foram a principal forma de transporte de nitrogênio pela seiva do xilema. A análise do perfil de aminoácidos pela seiva do xilema indicou a asparagina (ASN) como o aminoácido mais proeminente. Desta forma, conclui-se que plantas de *Inga macrophylla* tem a capacidade de usar o nitrogênio mineral tanto na forma de amônio quanto de nitrato na concentração de 5 mM favorecendo o crescimento, além de possuir estratégias para conciliar o uso do nitrogênio mineral e manter a fixação do N_2 .

Palavras chave: leguminosas arbóreas, fixação biológica do nitrogênio, trocas gasosas.

ABSTRACT

The carbon assimilation depends essentially on the ability of plants to capture and use the primary recourses available, of which stand out the form and amount of nitrogen. Legumes species, when in symbioses with soil bacteria, fix atmospheric nitrogen (N_2) and endow plants with higher content of this nutrient. However, the availability of mineral nitrogen in soil as nitrate and ammonium can reduce the biological nitrogen fixation process and bring on changes on transport of nitrogen compounds by xylem. Thus, information related to the use of different nitrogen forms by species of leguminous are important to better understand the use of nitrogen, the effect on photosynthesis, and consequently the growth and biomass gain. The objective of this research was to investigate the growth response, carbon assimilation, the sensitivity of the biological nitrogen fixation process and possible modifications of transported compounds by xylem in young plants nodulated of *Inga macrophylla* and subjected to fertilization with different forms of mineral nitrogen (nitrate and ammonium) at a concentration of 5 mM. During 150 days of experiment and at regular intervals the following variables were determined: relative and absolute growth rate in height and diameter; leaf morphology; nodulation; accumulation and allocation of dry mass; foliar and root nutrient content; pigment chloroplastid contents; chlorophyll *a* fluorescence; gas exchange; nitrate, ammonium and ureide accumulation in leaf, root, nodules and sap and the transport of nitrogen compounds via the xylem. In general, ammonium and nitrate fertilization promoted the highest relative and absolute growth rates in height compared with other treatments, while the fertilization with ammonium resulted in higher accumulation of total dry mass and investment in total leaf area and average leaf area. Leaf nitrogen content did not differ between the treatments, indicating the nitrogen contribution from biological fixation in non-fertilized plants. Regarding the physiological aspect, the fertilization with nitrate proportionate higher investment in Chl *a*, Chl *b*, C_{x+c} , Chl_{total} . Difference was not observed between photosynthesis values, as well as to the variables F_v/F_m , PI_{ABS} e PI_{tot} . Although, plants fertilized with ammonium exhibited stomatal limitation. The fertilization with nitrate favored the nodulation, while the ammonium partially inhibited the nodulation. In all the treatments the ureides were the main form of N transport by xylem sap. The analysis of amino acid profile by xylem sap indicated the asparagine (ASN) as the most prominent amino acid. In this way, it concludes that plants of *Inga macrophylla* has the ability to use the mineral nitrogen both as ammonium as nitrate form at a concentration of 5 mM favoring growth, besides have strategies to conciliate use of mineral nitrogen and maintain the N_2 fixation.

Keywords: Leguminous trees, biological nitrogen fixation, gas exchange.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE TABELAS	12
<i>Nitrogênio no ambiente</i>	15
<i>Absorção, transporte, redução e assimilação do NO_3^- e NH_4^+</i>	16
<i>Nitrogênio e leguminosas: influência do nitrogênio mineral na nodulação</i>	17
<i>Metabolismo do nitrogênio e do carbono</i>	18
<i>Transporte dos compostos nitrogenados</i>	19
<i>Inga macrophylla Humb. & Bonpl. ex Willd.....</i>	20
OBJETIVOS.....	22
Geral	22
Específicos	22
MATERIAL E MÉTODOS	23
<i>Área de estudo e implantação do experimento</i>	23
<i>Material biológico e cultivo inicial das plantas.....</i>	23
<i>Inoculação</i>	23
<i>Definição dos tratamentos</i>	24
<i>Aplicação da solução nutritiva</i>	24
<i>Análise de crescimento.....</i>	25
<i>Morfologia foliar.....</i>	25
<i>Massa seca</i>	26
<i>Teores foliares e radiculares de macro e micronutrientes</i>	26
<i>Teores de pigmentos cloroplastídicos</i>	27
<i>Fluorescência da clorofila a</i>	27
<i>Trocas gasosas foliares.....</i>	28
<i>Extração de compostos nitrogenados</i>	29
<i>Análise quantitativa de nitrato</i>	29
<i>Análise quantitativa de amônio.....</i>	29
<i>Análise quantitativa de ureídeos</i>	30
<i>Análise de aminoácidos por cromatografia líquida de alta performance (HPLC)</i>	30
<i>Delineamento experimental.....</i>	31
RESULTADOS E DISCUSSÃO	32

<i>Crescimento</i>	32
<i>Morfologia foliar</i>	34
<i>Partição de massa seca</i>	35
<i>Número e peso específico dos nódulos</i>	38
<i>Teores foliares e radiculares de nutrientes</i>	40
<i>Teores de pigmentos cloroplastídicos e fluorescência da clorofila a</i>	43
<i>Trocas gasosas</i>	45
<i>Quantificação dos compostos nitrogenados</i>	50
<i>Perfil de aminoácidos da seiva</i>	54
CONCLUSÃO	57
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Crescimento em altura (cm) (A) e diâmetro (mm) (B) de plantas jovens noduladas e não noduladas de *Inga macrophylla* recebendo solução nutritiva sem nitrogênio mineral (-N) e contendo 5 mM de amônio (NH_4^+) ou nitrato (NO_3^-) durante 150 dias ($n=15$).32
- Figura 2: Taxa de crescimento relativo (TCR) (A) e absoluto (TCA) (B) em altura e diâmetro de plantas jovens noduladas e não noduladas de *Inga macrophylla* recebendo solução nutritiva sem nitrogênio mineral (-N) e contendo 5 mM de amônio (NH_4^+) ou nitrato (NO_3^-). Os valores são médias e as linhas verticais os desvios-padrão. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan ($p \geq 0,05$) ($n=5$).33
- Figura 3: Acúmulo de massa seca total, foliar, caulinar, radicular e dos nódulos de plantas jovens noduladas e não noduladas de *Inga macrophylla* recebendo solução nutritiva sem nitrogênio mineral (-N) e contendo 5 mM de amônio (NH_4^+) ou nitrato (NO_3^-). As letras minúsculas comparam o acúmulo de massa seca de cada parte da planta entre os tratamentos de fertilização e as letras maiúsculas o acúmulo de massa seca total. Médias seguidas da mesma não diferem entre si pelo teste de Duncan ($p \geq 0,05$) ($n=15$).36
- Figura 4: Número (A) e peso específico dos nódulos (B) de plantas jovens noduladas e não noduladas de *Inga macrophylla* recebendo solução nutritiva sem nitrogênio mineral (-N) e contendo 5 mM de amônio (NH_4^+) ou nitrato (NO_3^-). Os valores são médias e as linhas verticais os desvios-padrão. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan ($p \geq 0,05$) ($n=5$).38
- Figura 5: Curva resposta da fotossíntese (P_N) em função do aumento da irradiância de plantas jovens noduladas e não noduladas de *Inga macrophylla* recebendo solução nutritiva sem nitrogênio mineral (-N) e contendo 5 mM de amônio (NH_4^+) ou nitrato (NO_3^-). As linhas representam o ajuste dos dados utilizando o modelo exponencial. As barras verticais representam o desvio-padrão.46
- Figura 6: Distribuição do conteúdo de nitrato, ureídeos, amônio e aminoácidos na seiva do xilema de plantas jovens noduladas e não noduladas de *Inga macrophylla* recebendo solução nutritiva sem nitrogênio mineral (-N) e contendo 5 mM de amônio (NH_4^+) ou nitrato (NO_3^-).53
- Figura 7: Perfil de aminoácidos na seiva do xilema de plantas jovens noduladas e não noduladas de *Inga macrophylla* recebendo solução nutritiva sem nitrogênio mineral (-N) e contendo 5 mM de amônio (NH_4^+) ou nitrato (NO_3^-) ($n=5$). Aspartato (Asp), glutamato (Glu), asparagina (Asn), Ácido gama-aminobutírico (Gaba).55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Área foliar média (AFM), área foliar total (AFT) e área foliar específica (AFE) de plantas jovens noduladas e não noduladas de *Inga macrophylla* recebendo solução nutritiva sem nitrogênio mineral (-N) e contendo 5 mM de amônio (NH_4^+) ou nitrato (NO_3^-). Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan ($p \geq 0,05$) ($n=5$).34

Tabela 2: Teores foliares e radiculares de nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca) e magnésio (Mg) e de plantas jovens noduladas e não noduladas de *Inga macrophylla* recebendo solução nutritiva sem nitrogênio mineral (-N) e contendo 5 mM de amônio (NH_4^+) ou nitrato (NO_3^-). Os valores são médias±desvio-padrão. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan ($p \geq 0,05$) ($n=5$).42

Tabela 3: Teores foliares e radiculares de ferro (Fe), zinco (Zn), cobre (Cu) e manganês (Mn) de plantas jovens noduladas e não noduladas de *Inga macrophylla* recebendo solução nutritiva sem nitrogênio mineral (-N) e contendo 5 mM de amônio (NH_4^+) ou nitrato (NO_3^-). Os valores são médias±desvio-padrão. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan ($p \geq 0,05$) ($n=5$).43

Tabela 4: Teores de pigmentos cloroplásticos na base da massa ($\mu\text{mol/g}$), rendimento quântico máximo do PSII (F_v/F_m), índice de desempenho (PI_{ABS}) e índice de desempenho total (PI_{total}) de plantas jovens noduladas e não noduladas de *Inga macrophylla* recebendo solução nutritiva sem nitrogênio mineral (-N) e contendo 5 mM de amônio (NH_4^+) ou nitrato (NO_3^-). Os valores são médias±desvio-padrão. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan ($p \geq 0,05$) ($n=5$).44

Tabela 5: Características fotossintéticas de plantas jovens noduladas e não noduladas de *Inga macrophylla* recebendo solução nutritiva sem nitrogênio mineral (-N) e contendo 5 mM de amônio (NH_4^+) ou nitrato (NO_3^-). Fotossíntese máxima (P_{Nmax}), respiração no escuro (R_d), rendimento quântico (α), irradiância de compensação (I_c), irradiância de saturação (I_s), condutância estomática (g_{s2000}), transpiração (E_{2000}). Os valores são médias±desvio-padrão. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan ($p \geq 0,05$) ($n=5$). ..47

Tabela 6: Eficiência fotossintética no uso de macro e micronutrientes de plantas jovens noduladas e não noduladas de *Inga macrophylla* recebendo solução nutritiva sem nitrogênio mineral (-N) e contendo 5 mM de amônio (NH_4^+) ou nitrato (NO_3^-). Os valores são médias±desvio-padrão. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan ($p \geq 0,05$) ($n=5$).49

Tabela 7: Teores de nitrato, amônio e ureídeos em folhas, raízes, nódulos de plantas jovens noduladas e não noduladas de *Inga macrophylla* recebendo solução nutritiva sem nitrogênio mineral (-N) e contendo 5 mM de amônio (NH_4^+) ou nitrato (NO_3^-). Os valores são médias±desvio-padrão. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan ($p \geq 0,05$) ($n=5$).51

INTRODUÇÃO

As florestas tropicais possuem grande diversidade de espécies da família Fabaceae (Sprent 2009). Algumas dessas espécies contribuem para a riqueza de nitrogênio em solos de florestas tropicais mediante a capacidade de fixação do nitrogênio atmosférico (N_2), o que permite o crescimento e armazenamento de carbono por essas espécies em condições de baixa disponibilidade de nitrogênio no solo (Hedin *et al.* 2009; Batterman *et al.* 2013).

As espécies fixadoras de nitrogênio são capazes de ajustar suas taxas de fixação mediante a disponibilidade de nitrogênio mineral no solo, encontrado, principalmente, na forma de nitrato (NO_3^-) e amônio (NH_4^+) (Barron *et al.* 2011; Batterman *et al.* 2013). Em alguns casos, na presença destes nutrientes, a planta pode deixar de fazer simbiose e passar a utilizar as formas de nitrogênio presentes no solo, ocorrendo assim uma redução da nodulação e da fixação biológica do nitrogênio (FBN) (Glyan'ko *et al.* 2009; Datta *et al.* 2009; Naudin *et al.* 2010). Por outro lado, em condições controladas, em algumas espécies pode ser observada maior tolerância da FBN frente à disponibilidade das formas minerais de nitrogênio. Dependendo da forma e da concentração fornecida, as plantas inoculadas podem exibir maiores taxas de crescimento e ganho de biomassa do que as plantas que dependem apenas da FBN (Souza *et al.* 2012; Omena-Garcia *et al.* 2011; Moreira *et al.* 2014).

A presença das formas minerais de nitrogênio no meio de crescimento de algumas leguminosas, além de ter implicações no processo simbiótico, tem influenciado nas respostas de assimilação de carbono (Dan e Brix *et al.* 2009; Camargos *et al.* 2010). Desta forma, respostas ecofisiológicas relacionadas ao metabolismo do nitrogênio são fundamentais para o entendimento do crescimento desse grupo de plantas. Os metabolismos do nitrogênio (N) e do carbono (C) apresentam uma forte relação, uma vez que a capacidade das plantas em assimilar o CO_2 varia consideravelmente em função do conteúdo de nitrogênio foliar. Da mesma forma, a absorção de nitrogênio depende das taxas fotossintéticas, tendo em vista que o processo de absorção, redução, assimilação e transporte de nitrogênio requer alto custo energético (Downie 2005).

As diferentes formas de assimilação de nitrogênio pelas plantas também implicam em modificações no transporte dos compostos nitrogenados. Em algumas espécies de leguminosas tem sido observado que quando a forma de nitrogênio absorvida é NO_3^- , os produtos exportados são preferencialmente as amidas asparagina (ASN) e glutamina (GLN) (Amarante *et al.* 2006). Enquanto que em outras espécies tropicais dependentes

exclusivamente da FBN a presença de ureídeos tem sido utilizada para estimar as taxas de FBN (King e Purcell 2005).

Em vista das relações apresentadas entre os metabolismos do N e C em espécies de leguminosas, pesquisas com essa abordagem podem contribuir para o entendimento dos mecanismos fisiológicos relacionados à utilização de nitrogênio mediante a investigação do metabolismo do nitrogênio nas leguminosas arbóreas de interesse ecológico para a região amazônica. Com intuito de investigar essas respostas, o grupo de pesquisa do Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Vegetal do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia realizou estudos iniciais com a espécie *Inga edulis* em seu estado juvenil. Diante dos primeiros resultados obtidos por essa espécie, verificou-se o favorecimento da nodulação e assimilação do carbono com o fornecimento de N mineral na forma de NH_4^+ (Omena-Garcia *et al.* 2011; Souza *et al.* 2012; Omena-Garcia *et al.* 2015). Esses resultados sinalizaram para diferentes implicações relacionadas à integração entre o metabolismo do N e do C em plantas jovens de Fabaceae do gênero *Inga*.

Assim, buscar a uniformidade ou não de respostas acerca das diferentes formas de N preferencialmente absorvidas, dos efeitos das formas minerais de N sobre a fixação biológica e os desdobramentos na fixação do carbono em espécies desse gênero tornaram-se um desafio bastante interessante, considerando o papel ecológico dessas espécies na região amazônica por ter importante papel na silvicultura tropical e principalmente na recuperação de áreas alteradas (Nichols e Carpenter 2006; Lojka *et al.* 2012). Dentre as espécies de Fabaceae que nodulam do gênero *Inga*, a espécie *Inga macrophylla* foi escolhida a partir de informações que confirmam a capacidade de nodulação dessa espécie (Gehring *et al.* 2005; Souza 2012).

Para tanto, buscou-se responder algumas perguntas: A adubação nitrogenada favorecerá ou inibirá parcia/totalmente a nodulação desta espécie? A adubação associada à inoculação potencializará o crescimento e a assimilação de carbono pelas plantas? Haverá diferenças no transporte dos compostos nitrogenados mediante a forma de N fornecida? Diante desses questionamentos e, em linhas gerais, nesse estudo investigou o efeito da fertilização nitrogenada sobre o crescimento, a assimilação do carbono, no processo de FBN e no transporte de N da espécie *Inga macrophylla*.

REFERENCIAL TEÓRICO

Nitrogênio no ambiente

O nitrogênio (N) é o elemento essencial mais requerido pelas plantas, sendo também o elemento mais limitante para o crescimento e desenvolvimento, uma vez que é constituinte de biomoléculas, que por sua vez, integram complexas vias metabólicas altamente reguladas (Silva *et al.* 2012; Santiago *et al.* 2013). O N está disponível no solo em diversas formas que são utilizadas pelas plantas incluindo, amônio, nitrato e aminoácidos (Paungfoo-Lonhienne *et al.* 2008).

Na natureza, o nitrogênio molecular (N₂) encontrado na atmosfera corresponde a 78% dos gases e, embora seja a fonte mais abundante, pouca é a disponibilidade para as plantas devido à sua estabilidade química. Entretanto, algumas plantas leguminosas conseguem estabelecer associação simbiótica com bactérias fixadoras de N₂. Estes microorganismos procariotos possuem um exclusivo mecanismo bioquímico capaz de quebrar a tripla e estável ligação covalente do N₂ e disponibilizá-lo em forma assimilável pelas plantas. Desta forma, a fixação biológica pode fornecer mais de 90% do N necessário para o desenvolvimento das plantas (Vitousek *et al.* 2013).

Outra fonte de N é a matéria orgânica presente no solo. Nos solos, o N é utilizado pelas plantas na forma nítrica (NO₃⁻) e amoniacal (NH₄⁺), sendo a primeira mais abundante, devido à ação de bactérias nitrificantes que promovem a oxidação de amônio livre, num processo chamado de nitrificação. Entretanto, condições ácidas do solo inibem a ação desses microorganismos, mantendo os íons amônio protonados e retidos na carga líquida negativa do solo (Klotz e Stein 2008). Como o solo possui carga elétrica líquida negativa, o NO₃⁻ não se liga eletrostaticamente a esta matriz, sendo facilmente lixiviado quando não absorvido pelo sistema radicular das plantas. Isto indica que o N de ambas as formas pode ser absorvido pelas plantas em taxas e proporções que variam de acordo com os fatores genéticos e ambientais (Ward *et al.* 2007).

Na região amazônica, onde a precipitação pluviométrica é elevada (superior a 2000 mm anuais), o regime pluviométrico pode influenciar grandemente a concentração de N mineral no solo, pois, além de afetar a atividade e o crescimento microbianos, também favorece a migração da forma nítrica no perfil do solo (Luizão *et al.* 1992). No estudo de Santiago *et al.* (2013), foi observado que independentemente do tipo de vegetação (áreas de

sistemas agroflorestais e floresta secundária) e da época de coleta (período seco e chuvoso), o N amoniacal predominou sobre o N nítrico, no solo. O NH_4^+ representou 77% do N mineral na época chuvosa e 63,4% na época seca.

O predomínio de NH_4^+ sobre o NO_3^- no solo pode ser resultado de muitos fatores, como a maior lixiviação da forma nítrica no perfil do solo (Crusciol *et al.* 2011), assim como, pela desnitrificação (Metay *et al.* 2007). A assimilação preferencial de NO_3^- , tanto por plantas como por microorganismos no solo também pode contribuir para o predomínio do NH_4^+ no solo (Owen e Jones 2001).

Absorção, transporte, redução e assimilação do NO_3^- e NH_4^+

Em plantas de cevada foi verificado que o NO_3^- possui três sistemas de absorção. Um desses sistemas é aparentemente constitutivo e de baixa afinidade (Alto Km), funcionando apenas em concentrações bastante altas de NO_3^- . Os outros dois sistemas são de alta afinidade e atuam em condições de baixa concentração de NO_3^- . Isto é considerado um exemplo marcante da evolução das estratégias de obtenção do N pelas raízes das plantas a partir dos solos permitindo à adaptação de espécies a ambientes com alta e baixa concentração de NO_3^- (Sodek 2004). O transporte de NO_3^- pelas membranas é do tipo simporte (H^+/NO_3^-) e o K^+ é requerido para o balanço de cargas no ambiente celular (Rogato *et al.* 2010).

Quando absorvido pelas raízes, o NO_3^- pode ser reduzido ou armazenado nos vacúolos das raízes, ou ainda ser translocado para a parte aérea, onde será reduzido ou armazenado nos vacúolos foliares. O primeiro passo da redução de NO_3^- ocorre no citosol e envolve a ação da enzima redutase do nitrato (RN) (EC 1.6.6.1), produzindo nitrito (NO_2^-), o qual adentra os plastídeos das raízes e os cloroplastos de folhas. Em seguida, o NO_2^- é reduzido a NH_4^+ por ação da enzima redutase do nitrito (RNi) (EC 1.7.2.1) (Heidari *et al.* 2011).

A assimilação do NH_4^+ , ou seja, a incorporação do N em aminoácidos é feita por meio de uma conversão do nitrogênio-amônio em nitrogênio-amino, resultante da ação conjunta do sistema enzimático sintetase da glutamina (GS; EC 6.3.1.2) localizado nos cloroplastos e citoplasma de folhas e células de raízes e, 2-oxoglutarato aminotransferase da glutamina ou sintetase do glutamato (GOGAT; EC 1.4.1.13), presentes nos cloroplastos de folhas e plastídeos de raízes. A partir dos primeiros compostos formados, glutamina (GLN) e

glutamato (GLU), todos os demais compostos orgânicos nitrogenados são produzidos pela ação de transaminases (Hirel *et al.* 2011).

A natureza prejudicial do NH_4^+ exige sua rápida assimilação, evitando seu acúmulo nos tecidos vegetais. Para esse fim, os tecidos possuem um eficiente sistema de assimilação que funciona em baixas concentrações de NH_4^+ (Holzschuh *et al.* 2009). O mecanismo de absorção de NH_4^+ pelas raízes, quando as concentrações na rizosfera são baixas ($\leq 1 \text{ mmol L}^{-1}$), ocorre de forma ativa, através de transportadores (Ortiz-Ramirez *et al.* 2011). A assimilação do NH_4^+ pelas plantas ocorre pelo complexo enzimático GS/GOGAT como descrito acima.

Muitas espécies têm preferência em absorver N mineral na forma de NH_4^+ , o que pode estar relacionado ao fato de haver um menor gasto de energia para este processo quando comparado ao NO_3^- . Pode-se inferir também que esta preferência esteja ligada a outros fatores como a melhor adaptação de algumas espécies em solos com altos teores de NH_4^+ , a concentração de cada nutriente no solo e ainda a influência dos teores de aminoácidos livres no sistema radicular (Warren *et al.* 2009; Helali *et al.* 2010).

Nitrogênio e leguminosas: influência do nitrogênio mineral na nodulação

Sob condições de baixa disponibilidade de N mineral no ambiente, bactérias presentes nos solos estabelecem relação simbiótica com espécies de leguminosas. Atualmente, já foram identificados 13 gêneros de bactérias distribuídas em sete famílias que possuem a capacidade de nodular espécies de Fabaceae (Moreira 2008). Esta associação simbiótica, denominada fixação biológica do nitrogênio (FBN), acontece quando as bactérias infectam o sistema radicular das plantas e o N_2 atmosférico de baixa reatividade é capturado pelas bactérias e reduzido à amônia (NH_3) pela ação da enzima nitrogenase dentro dos nódulos (Reis 2013). A NH_3 produzida é protonada a NH_4^+ sendo liberada no citoplasma e assimilada pelo complexo enzimático GS/GOGAT descrito anteriormente (Hirel *et al.* 2011).

A capacidade de algumas espécies da família Fabaceae de se associar a bactérias, tornaram este grupo de plantas substancialmente especial, pois a FBN tem implicações econômicas e ecológicas. Além disso, estas espécies apresentam vantagens competitivas com relação às demais, principalmente, quando crescem em solos pobres em N, que quando fixado, acaba sendo utilizado por plantas de outras famílias botânicas após a mineralização da

matéria orgânicas e, deste modo, todas as espécies vegetais acabam sendo beneficiadas por este processo (Rogers *et al.* 2009).

Entretanto, em algumas espécies vegetais, a associação simbiótica não é estabelecida quando existe disponibilidade de nitrogênio mineral no solo, logo, as plantas absorvem apenas o nitrogênio disponível no solo, principalmente nas formas de NO_3^- e NH_4^+ (Barron *et al.* 2011; Batterman *et al.* 2013). O mecanismo metabólico que leva à preferência do NO_3^- em relação à fixação simbiótica e os mecanismos que proporcionam tolerância do sistema simbiótico à presença de NO_3^- no meio são pouco conhecidos, sendo o ponto chave para a obtenção de leguminosas capazes de se manterem em associação simbiótica efetiva, mesmo em ambiente com disponibilidade de N mineral (Bollman e Vessey 2006; Camargos 2007).

Existem evidências de que quando a planta nodulada é colocada para “escolher” entre N mineral e N_2 da fixação, a primeira forma é “preferida”, substituindo a fixação de N_2 pelo N mineral (Glyan’ko *et al.* 2009; Datta *et al.* 2009). Além disso, foi sugerido que a redução do número de nódulos e a FBN em *Inga* sp., crescendo em condições naturais, está intimamente correlacionada com os teores de N do solo (Barron *et al.* 2011). Por outro lado, o estudo realizado com *Inga edulis* aponta que a fonte amoniacal favoreceu o aumento da nodulação (Omena-Garcia *et al.* 2011) e em plantas de *Calopogonium mucunoides* continuaram fixando mesmo na presença de NO_3^- na concentração de 15 mM (Camargos e Sodek 2010).

Esta mudança preferencial pelo metabolismo de NO_3^- em detrimento à associação simbiótica é desfavorável à utilização econômica das leguminosas, o ideal seria que fossem insensíveis, ou com pouca sensibilidade (Camargos 2007). Desta maneira, haveria maior disponibilidade de N para as plantas. Conduto é de grande importância a condução de estudos que associem o fornecimento de N mineral para espécies de plantas capazes de realizar simbiose com bactérias sem que a FBN seja afetada.

Metabolismo do nitrogênio e do carbono

O metabolismo do N possui forte relação com o metabolismo do carbono (C), uma vez que os produtos da fotossíntese ou da oxidação de açúcares fornecem a energia necessária para a absorção e redução do N mineral e para a fixação do N_2 , enquanto que a capacidade das plantas em assimilar o CO_2 varia consideravelmente em função do conteúdo de N foliar (Pasquini e Santiago 2012).

Desta forma, em espécies arbóreas, os metabolismos do N e C são considerados fatores determinantes para o acúmulo de biomassa (Lawlor 2002). O fornecimento de N mineral favorece o aumento da área foliar em algumas espécies (Helali *et al.* 2010; Andrews *et al.* 2013). Alguns estudos têm mostrado que a área foliar específica (AFE) está significativamente correlacionada à concentração de N foliar, assimilação do carbono e produção de tecidos fotossintetizantes, o que corresponde ao aumento das taxas fotossintéticas (Konnerup e Brix 2010; Bloom *et al.* 2012; Souza *et al.* 2012).

No processo fotossintético, parte do N presente nas folhas é destinado à regulação da cadeia transportadora de elétrons como os complexos-antena, onde estão presentes proteínas e pigmentos cloroplastídicos que possuem N em sua estrutura, desta forma, o suprimento adequado de N favorece a captura de fótons pelas moléculas de clorofilas, na etapa fotoquímica da fotossíntese, e essas respostas podem ser confirmadas mediante as variáveis de fluorescência da clorofila *a* (Eichelmann *et al.* 2005; Salomon *et al.* 2013). A importância do uso desse método nesta pesquisa é por se tratar de um método não invasivo e preciso, além de fornecer informações quantitativas sobre o estado das plantas e suas respectivas vitalidades derivadas dos princípios das reações Red-Ox mediante a absorção e conservação do fóton absorvido pelo fotossistema II por moléculas de clorofilas (Papageorgiou e Govindjee 2004; Srivastava *et al.* 1999; Strasser *et al.* 2010).

Na etapa bioquímica da fotossíntese, o N é constituinte da enzima ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase (rubisco) responsável pela fixação do carbono, assim, o suprimento inadequado de N pode reduzir a capacidade de assimilação do carbono pelas plantas (Eichelmann *et al.* 2005). No caso de algumas espécies de leguminosas, a FBN pode atender a demanda de N resultando em um aumento significativo no acúmulo de N nas folhas. No entanto, em termos de aquisição de N, esse benefício é acompanhado por um aumento nas taxas fotossintéticas em relação às plantas fertilizadas com N mineral por demandarem de maior energia para o processo de FBN. Portanto, a fixação do N₂ será limitada pela disponibilidade fotoassimilados se não houver simultâneo aumento das taxas de fotossíntese (Ismande 1988; Kaschuk *et al.* 2009).

Transporte dos compostos nitrogenados

O perfil dos compostos nitrogenados transportados pelo xilema constitui-se em uma ferramenta importante para a obtenção de dados referentes ao metabolismo do sistema

radicular e ajuda a descrever o desempenho fisiológico das espécies arbóreas (Pfautsch *et al.* 2009). O perfil de aminoácidos do xilema varia em função da fonte primária de N disponível para a absorção e, ainda, para alguns grupos, como no caso das leguminosas, a capacidade de fixar o N do ar (Lea *et al.* 2007). Espécies pertencentes à tribo Phaseoleae, dependendo exclusivamente da FBN, têm como principais compostos orgânicos nitrogenados presentes na seiva do xilema os ureídeos. Por outro lado, quando o N provém da redução assimilatória do NO_3^- , os produtos exportados são as amidas, principalmente asparagina (ASN) e glutamina (GLN) (Amarante *et al.* 2006).

A diferença dos compostos transportados conforme a fonte de N primária também foi evidenciada nos resultados obtidos em plantas de soja apenas noduladas, cujo principal meio de transporte de nitrogênio dos nódulos para a parte aérea foi na forma de ureídeos, além do aminoácido ASN (King e Purcell 2005). O mesmo foi observado em condições de alagamento (Amarante *et al.* 2006). Sob o fornecimento de NO_3^- e NH_4^+ os aminoácidos ASN e GLN predominaram (Amarante *et al.* 2006; Omena-Garcia *et al.* 2011).

Dentre os aminoácidos utilizados no transporte de N pelas plantas, a ASN caracteriza-se por ser menos reativa e mais solúvel, desta forma é ideal para transportes a longas distâncias, particularmente, quando comparada à GLN. Outra vantagem no transporte de ASN é a baixa relação N:C de (2:4) quando comparada à GLN (2:5) ou ao glutamato (GLU) (1:5) (Siecichowicz *et al.* 1988).

Os compostos nitrogenados resultantes da FBN são as ureídas alantoína, ácido alantóico e a citrulina. Estas ureídas possuem uma razão N:C alta (4:4) como nas amidas, porém a solubilidade destes compostos é menor em relação às amidas. O NO_3^- também é encontrado na seiva do xilema, desta forma, a sua presença é um indicativo da absorção e transporte de NO_3^- a partir do sistema radicular (Schmidt e Stewart 1998).

Inga macrophylla Humb. & Bonpl. ex Willd.

Inga macrophylla é uma espécie arbórea pertencente à família Fabaceae, cultivada em toda Amazônia também encontrada em países como a Bolívia, Colômbia e Peru. A espécie é popularmente conhecida como inga-chata ou ingá-peluda e é caracterizada por produzir vagens grandes e achatadas com presença de pêlos. A espécie é classificada como secundária inicial, apresentando crescimento rápido e nódulos radiculares eficientes para fixação de N_2 (Souza 2012).

HIPÓTESES

No presente estudo pretendeu-se relacionar o efeito de diferentes formas de fertilização nitrogenada no crescimento, assimilação do carbono e fixação biológica do nitrogênio, bem como aferir sua contribuição no transporte de compostos nitrogenados via xilema. Nesse sentido, foram elaboradas as seguintes hipóteses:

- (i) As plantas de *Inga macrophylla* inoculadas apresentarão maior crescimento e acúmulo de massa seca quando fertilizadas com amônio na concentração de 5 mM;
- (ii) A fertilização nitrogenada, independente da forma, promoverá aumento da capacidade fotossintética. Contudo, não aumenta a eficiência fotossintética no uso do nitrogênio;
- (iii) A fertilização com amônio favorecerá a nodulação de plantas de *Inga macrophylla* enquanto que o nitrato promoverá inibição parcial.
- (iv) O transporte de compostos nitrogenados vai diferir mediante a forma de nitrogênio fornecida: plantas utilizando apenas o nitrogênio molecular da FBN irão transportar preferencialmente ureídeos, por outro lado, quando fertilizadas com nitrogênio mineral, transportarão os aminoácidos asparagina e glutamina.

OBJETIVOS

Geral

Investigar as respostas de crescimento, assimilação do carbono, a sensibilidade do processo de fixação biológica do nitrogênio e as possíveis alterações dos compostos transportados via xilema em plantas jovens noduladas de *Inga macrophylla* cultivadas com diferentes formas de nitrogênio mineral (NH_4^+ e NO_3^-).

Específicos

- Determinar as taxas de crescimento (absoluto e relativo) e alocação de massa seca (folhas, caules, raízes e nódulos) de plantas jovens de *Inga macrophylla* sob fertilização de nitrogênio mineral;
- Relacionar o uso das diferentes formas de nitrogênio no processo de assimilação do carbono;
- Analisar a sensibilidade/tolerância da nodulação e da fixação biológica do nitrogênio sob a fertilização de nitrogênio mineral quanto à capacidade de nodulação e a presença de ureídeos na seiva do xilema;
- Quantificar os principais compostos nitrogenados no transporte e armazenamento do nitrogênio em plantas utilizando diferentes formas de nitrogênio (NO_3^- , NH_4^+ e N_2).

MATERIAL E MÉTODOS

Área de estudo e implantação do experimento

O experimento foi realizado em regime de casa de vegetação do Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Vegetal (LFBV), campus III do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Manaus, AM, Brasil (3°05'30" S e 59°59'36" W). Os valores de temperatura na casa de vegetação entre 8:00 e 12:00 h variaram entre 28°C e 34°C, respectivamente e irradiância $1159 \pm 6,13 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (valores coletados ao meio dia).

Material biol\u00f3gico e cultivo inicial das plantas

As sementes de *Inga macrophylla* foram cedidas pelo laborat\u00f3rio de Microbiologia do Solo e coletadas na Esta\u00e7\u00e3o Experimental de Silvicultura Tropical do INPA (ZF-1, km 6 da BR-174), em Manaus em novembro de 2013. Inicialmente, as sementes foram embebidas em \u00e1gua destilada durante 24h e, em seguida, semeadas em bandejas pl\u00e1sticas contendo areia lavada e peneirada, onde germinaram sob condi\u00e7\u00f5es de viveiro. Ap\u00f3s 60 dias do in\u00edcio da germina\u00e7\u00e3o, as pl\u00e2ntulas foram transferidas para sacos de polietileno de 5 litros, contendo areia, onde permaneceram durante 45 dias para que as reservas nutricionais provenientes dos cotil\u00e9dones fossem completamente utilizadas e que as pl\u00e2ntulas se aclimassem na casa de vegeta\u00e7\u00e3o do LFBV. Posteriormente, as plantas foram transferidas para sacos de polietileno de 5 litros contendo vermiculita como substrato. As plantas foram selecionadas de acordo com uniformidade de altura, n\u00famero de folhas e estado fitossanit\u00e1rio.

Inocula\u00e7\u00e3o

A metodologia utilizada para o preparo do inoculante foi \u00e0 proposta por Vincent (1970). Inicialmente foi feito o preparo do meio l\u00edquido YM (Yeast Mannitol) onde as bact\u00e9rias fixadoras cresceram e se multiplicaram. O meio YM foi distribu\u00eddo em erlenmeyers de 125 mL que foram tampados com algod\u00e3o e papel alum\u00ednio e selados com barbante, levados para a autoclave por 40 minutos \u00e0 press\u00e3o de 1 kgf/cm^2 e temperatura de 120°C. Ap\u00f3s a autoclavagem, com aux\u00edlio de uma al\u00e7a de platina, cada uma das bact\u00e9rias presentes

em tubos de ensaio da coleção (estirpes anteriormente já selecionadas para a espécie em estudo) foi repicada, permanecendo em agitador por 2-3 semanas até o crescimento e multiplicação das bactérias, indicado quando o meio se torna turvo. Após esse período, transferiu-se o meio com a bactérias crescidas para erlenmeyer de 1 L formando assim um coquetel de bactérias.

As plantas foram inoculadas uma semana após o transplântio para a vermiculita. Duas dosagens foram realizadas com intervalo de quinze dias. Em cada dosagem, as plantas receberam na altura do coleto, 5 mL de um coquetel contendo 7 bactérias (códigos usados: 832,833,834,841,842,850,852), isoladas a partir de nódulos obtidos de outras espécies do gênero *Inga* nativas da Amazônia. As estirpes utilizadas pertencem ao banco de germoplasma de rizóbios do laboratório de Microbiologia do Solo do INPA.

Definição dos tratamentos

O experimento consistiu de 60 plantas, com 15 repetições para cada tratamento:

T1- Controle (-N): Plantas não inoculadas receberam solução nutritiva sem adição de nitrogênio;

T2- Inoculado (-N): Plantas inoculadas receberam solução nutritiva sem adição de nitrogênio;

T3- I+NH₄⁺ (5 mM): Plantas inoculadas receberam solução nutritiva com 5 mM de amônio.

T4- I+NO₃⁻ (5 mM): Plantas inoculadas receberam solução nutritiva com 5 mM de nitrato;

Aplicação da solução nutritiva

Uma semana após a segunda inoculação, as plantas receberam 100 mL de solução nutritiva com macro e micronutrientes nas concentrações abaixo descritas, duas vezes na semana até o fim do experimento (150 dias). Foi aplicada a solução de Hoagland e Arnon (1950) modificada com pH 6,5 como descrito abaixo:

Solução + NO₃⁻: KNO₃⁻ (5 mM); MgSO₄.7H₂O (2 mM); KH₂PO₄ (1 mM); CaSO₄.2H₂O (2 mM); K₂SO₄ (2 mM); H₃BO₃ (0,046 mM); MnCl₂.4H₂O (9,1 μM); ZnSO₄.7H₂O (0,765 μM); CuSO₄.5H₂O (0,32 μM); H₂MoO₄ (0,56 μM).

Solução + NH₄⁺: (NH₄)₂SO₄ (2,5 mM); MgSO₄.7H₂O (2 mM); KH₂PO₄ (1 mM); CaSO₄.2H₂O (2 mM); K₂SO₄ (2 mM); H₃BO₃ (0,046 mM); MnCl₂.4H₂O (9,1 μM); ZnSO₄.7H₂O (0,765 μM); CuSO₄.5H₂O (0,32 μM); H₂MoO₄ (0,56 μM).

Solução -N: MgSO₄.7H₂O (2 mM); KH₂PO₄ (1 mM); CaSO₄.2H₂O (2 mM); K₂SO₄ (2 mM); H₃BO₃ (0,046 mM); MnCl₂.4H₂O (9,1 μM); ZnSO₄.7H₂O (0,765 μM); CuSO₄.5H₂O (0,32 μM); H₂MoO₄ (0,56 μM).

A solução de Fe foi acrescentada apenas no momento de se aplicar as soluções nas plantas. Para isso, cada tratamento recebeu na solução 1 mL/L de uma solução de Fe-EDTA contendo Na₂-EDTA (33,2 g L⁻¹); FeSO₄.7H₂O (25 g L⁻¹) e NaOH (3,65 g L⁻¹).

Análise de crescimento

As medidas biométricas foram realizadas em todas as plantas a cada quinze dias ao longo de todo o período experimental (150 dias). As medidas de altura (considerado até a gema apical) foram obtidas com uma fita métrica graduada em centímetros, e do diâmetro a altura do coleto, utilizando-se paquímetro digital (Mitutoyo – CD-8” CX-B). De posse dos dados de altura e diâmetro, foram calculadas as taxas de crescimento relativo (TCR) e absoluto (TCA) (Bugbee 1996; Davanso *et al.* 2002), a saber:

$$\begin{aligned} \text{TCR-a} &= (\ln A_2) - (\ln A_1)/t_2 - t_1; & \text{TCR-d} &= (\ln D_2) - (\ln D_1)/t_2 - t_1; \\ \text{TCA-a} &= A_2 - A_1/t_2 - t_1; & \text{TCA-d} &= D_2 - D_1/t_2 - t_1; \end{aligned}$$

Em que TCR é a taxa de crescimento relativo e TCA é a taxa de crescimento absoluto em altura (a) e diâmetro (d); A₂ é a altura final; A₁ altura inicial, D₂ diâmetro final e D₁ diâmetro inicial; T₂ é o tempo final do experimento e T₁ tempo inicial experimental.

Morfologia foliar

A área foliar média (AFM) e a área foliar total (AFT) foram determinadas de cinco plantas por tratamento no fim do experimento por meio de imagens digitalizadas em “scanner” de mesa, na resolução de 200 dpi arquivadas como imagem monocromática tipo bitmap e processadas no software Determinador Digital de Áreas (DDA) (Ferreira *et al.* 2008). A área foliar específica (AFE) foi determinada a partir de dez discos foliares de área

conhecida ($0,283 \text{ cm}^2$) retirados de cada planta, acondicionados em sacos de papel e submetidos à secagem em estufa a 65°C durante 72 horas. A AFE foi obtida pela razão entre a área foliar (cm^2) e massa foliar seca (g) (Evans e Potter 2001).

Massa seca

No fim do experimento as plantas foram seccionadas em folhas, caules, raízes e nódulos, posteriormente, acondicionados em sacos de papel para a secagem em estufa a 65°C até a obtenção de massa seca constante. Com o material seco, foi obtido a massa seca foliar, a massa seca caulinar, a massa seca das raízes, a massa seca dos nódulos e a massa seca total. Antes da secagem do material, o número de nódulos foi contabilizado. O peso específico dos nódulos (tamanho) foi obtido pela razão da massa seca dos nódulos (mg) pelo número de nódulos.

Teores foliares e radiculares de macro e micronutrientes

Os teores de macro e micronutrientes foliares e radiculares foram determinados ao final do experimento de cinco plantas por tratamento. Na seleção das amostras foram considerados o aspecto fitossanitário e a idade foliar, coletando-se somente folhas sadias, maduras e completamente expandidas. As amostras foram secas em estufa a 65°C até obtenção de massa constante. Em seguida, as amostras foram moídas para obtenção de material finamente pulverizado. A determinação dos teores de nitrogênio foi realizada em 0,1 g de matéria seca das amostras submetidas à pré-digestão durante uma noite, e posteriormente a digestão com duplo ácido ($\text{H}_2\text{O}_2 + \text{H}_2\text{SO}_4$), utilizando-se como catalisadores o sulfato de lítio e o selênio, a um aumento gradativo da temperatura de 50 em 50°C até 350°C , em intervalos de 30 minutos (Miyzawa *et al.* 1999). O nitrogênio total foi determinado de acordo com a metodologia de Kjeldahl, em alíquotas de 25 mL do extrato puro após a digestão. Os teores de fósforo foram determinados a partir de amostras contendo 0,5 g de matéria seca submetidas à digestão nitro-perclórica, com temperatura ajustada de 50 em 50°C até 210°C , em intervalos de 30 minutos. Em seguida, foram determinados por espectrofotometria a $\lambda=725 \text{ nm}$ (Vitti e Ferreira 1997). A partir do mesmo extrato nitro-perclórico foram retiradas alíquotas e os teores dos demais nutrientes (Ca, Mg, K, Fe, Zn, e Mn) foram determinados por espectrometria de absorção atômica (Perkin Elmer 1100B, Uberlingen, Alemanha).

A eficiência fotossintética no uso dos nutrientes [EFU (nutriente)] foi calculada por meio da razão entre as taxas de fotossíntese máxima (P_{Nmax}) estimada e os teores de nutrientes foliares para cada planta (Santos Junior *et al.* 2006).

Teores de pigmentos cloroplastídicos

Os teores de pigmentos cloroplastídicos foram determinados a partir de 0,1 g de material vegetal fresco de folhas maduras, expandidas e em adequado estado fitossanitário de cinco plantas de cada tratamento. O material vegetal foi macerado com 10 mL de acetona (100% v/v) + 10 mL de solução de acetona (80% v/v) contendo $MgCO_3$ (0,5% p/v). Posteriormente, o extrato foi filtrado em papel filtro qualitativo nº 2. O extrato foi lido em espectrofotômetro de acordo com as absorvâncias das clorofilas *a* (chl *a*), clorofila *b* (chl *b*) e carotenóides (C_{x+c}), respectivamente $\lambda = 663, 645$ e 480 nm (Lichtenthaler e Wellburn 1983). As concentrações das clorofilas no extrato foram calculadas na base da massa foliar ($\mu\text{mol g}^{-1}$), a partir das equações descritas por Hendry e Price (1993).

$$\text{chl } a \text{ (}\mu\text{mol g}^{-1}\text{)} = \frac{(12,7 \cdot A_{663} - 2,69 \cdot A_{645}) \cdot 1,119 \cdot V}{1000 \cdot \text{unidade de peso (g)}}$$

$$\text{chl } b \text{ (}\mu\text{mol g}^{-1}\text{)} = \frac{(22,9 \cdot A_{645} - 4,68 \cdot A_{663}) \cdot 1,102 \cdot V}{1000 \cdot \text{unidade de peso (g)}}$$

$$c_{x+c} \text{ (}\mu\text{mol g}^{-1}\text{)} = \frac{(A_{480} + 0,114 \cdot A_{663} - 0,638 \cdot A_{645}) \cdot V \cdot 1000}{112,5 \cdot \text{unidade de peso (g)}}$$

A: absorvância no comprimento de onda indicado

V: volume final do extrato clorofila-acetona (ml)

Por último foram calculadas as concentrações de clorofila total, as razões chl *a*/chl *b* e clorofila total/ carotenóides ($\text{chl}_{total}/c_{x+c}$).

Fluorescência da clorofila a

As análises das variáveis da fluorescência da clorofila *a* foram realizadas em todas as plantas aos 90 dias de experimentação por meio de um fluorômetro portátil (Plant Efficiency Analyser – MK2 – 9600, Hansatech, Norfolk, UK) entre 8:00 e 12:00 horas, em folhas maduras, completamente expandidas e em bom estado fitossanitário. Inicialmente as folhas

foram aclimatadas ao escuro por 30 minutos e posteriormente, foram expostas a um pulso de luz saturante de 650 nm durante 1 s, numa intensidade de $3000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. A partir das leituras foram obtidos o rendimento quântico máximo do PSII (F_v/F_m), o índice de desempenho (PI_{ABS}) e calculado o índice de desempenho total (PI_{total}) (Srivastava *et al.* 1999; Strasser *et al.* 2010).

Trocas gasosas foliares

As determinações fotossintéticas inerentes as curvas de resposta à intensidade luminosa (PN-I) foram realizadas nas mesmas folhas e no mesmo período que foram obtidas as leituras de fluorescência da clorofila *a*. As medições foram realizadas no período entre 08:00 e 12:00 horas, com o analisador de gás a infravermelho (IRGA) portátil, de sistema aberto, modelo LI 6400 (Li-Cor, USA). A câmara foliar foi ajustada sob concentração de $400 \mu\text{mol mol}^{-1}$ de CO_2 , temperatura de $31 \pm 1^\circ\text{C}$ e vapor de H_2O de $21 \pm 1 \text{ mmol mol}^{-1}$. Para estas medições as folhas foram inicialmente submetidas à irradiância de $1000 \mu\text{mol (quanta) m}^{-2} \text{s}^{-1}$ durante um período de 3 a 5 minutos para aclimação da folha às condições da câmara de medição. As curvas PN-I foram processadas considerando uma densidade de fluxo de fótons (PPFD) entre 0 e $2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ em escala decrescente de medição (2000, 1500, 1000, 750, 500, 250, 100, 75, 50, 25 e 0). O modelo exponencial foi usado para ajustar à curva de resposta fotossintética a intensidade luminosa para cada planta e a partir desse modelo foram estimados a fotossíntese máxima (P_{nmax}) e o rendimento quântico aparente (α) (Iqbal *et al.* 1997; Santos Júnior *et al.* 2013).

$$P_N = (P_{\text{Nmax}} + R_d) \{1 - \exp[-\alpha I / (P_{\text{Nmax}} + R_d)]\} - R_d$$

No modelo, I é a irradiância (\sim PPFD); P_N é a fotossíntese líquida ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$); P_{Nmax} é a fotossíntese líquida máxima sob condições de luz saturante ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$); R_d é a respiração no escuro ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) correspondente ao valor de P_N quando $I = 0 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$; e α é o rendimento quântico aparente da fotossíntese ($\text{mol CO}_2 \text{ mol quanta}^{-1}$).

Extração de compostos nitrogenados

A extração dos compostos nitrogenados em diferentes partes das plantas (folhas, raízes e nódulos) foi realizada no fim do experimento (150 dias) a partir de 1g de material fresco triturado com nitrogênio líquido, adicionalmente, acrescentou-se 10 mL de solução MCA (Metanol, Clorofórmio e Água, 60:25:15, v/v/v). O material permaneceu em repouso durante 24 horas. Posteriormente, foi adicionado 1 mL de Clorofórmio e 1,5 mL de H₂O para cada 4 mL de sobrenadante. Após 24 horas, o precipitado foi descartado e o sobrenadante coletado. O sobrenadante permaneceu durante 18 horas em banho-maria a 38°C para concentração das amostras. Ao final, o volume do extrato foi aferido e armazenado em freezer -20°C para posteriores análises de quantificação dos compostos nitrogenados (nitrato, amônio e ureídeos) (Bielecki e Turner 1966).

A seiva do xilema foi coletada entre 8:00 e 11:00 horas da manhã de cinco plantas por tratamento. Após o corte transversal do caule, as raízes foram submetidas à pressão com gás de nitrogênio com auxílio da bomba de pressão tipo Scholander, até ocorrer à exsudação da seiva. A coleta foi feita com o auxílio de capilares, posteriormente a seiva foi armazenada em eppendorfs para análises posteriores.

Análise quantitativa de nitrato

Em volume de 50 µL de seiva e de compostos nitrogenados extraídos de folhas, raízes e nódulos, foram adicionados 0,2 mL de ácido salicílico (5%) e deixados em repouso durante 30 minutos a temperatura ambiente. Decorrido esse tempo, foram acrescentados 4,75 mL de NaOH (2 N), e deixado em repouso durante uma hora. As absorbâncias foram acompanhadas em espectrofotômetro a $\lambda=410$ nm (Espectrofotômetro UV/Visível Ultrospec 2100 pro., Armesham Biosciences). O nitrato de potássio foi utilizado como padrão (Cataldo *et al.* 1975).

Análise quantitativa de amônio

Em volume de 200 µL das amostras de seiva, folhas, raízes e nódulos foram adicionados 2 mL da solução de fenol nitroprussiato de sódio. Posteriormente, 2 mL da solução de NaOH contendo fosfato de sódio e hipoclorito de sódio. Em seguida, os tubos

foram incubados a 37°C durante 35 minutos. Após o resfriamento em temperatura ambiente, as absorbâncias foram acompanhadas em espectrofotômetro a $\lambda=625$ nm (Espectrofotômetro UV/Visível Ultrospec 2100 pro., Armesham Biosciences). O sulfato de amônio foi utilizado como padrão (McCullough 1967).

Análise quantitativa de ureídeos

Na quantificação dos ureídeos foram utilizados 100 μ L de seiva, 50 μ L do extrato de folhas e 30 μ L das amostras de raízes e nódulos. Para ocorrer a primeira reação, hidrólise da alantoína em ácido alantóico, foram pipetados nos tubos de ensaio com as amostras, água destilada para completar o volume em 750 μ L, 250 μ L de NaOH e 20 μ L de fenilhidrazina que posteriormente, foram aquecidos a 100°C durante oito minutos e resfriados a temperatura ambiente.

A segunda reação, hidrólise do ácido alantóico em glioxalato, ocorreu a partir da adição de 250 μ L de HCl (0,65 N) e em seguida foram aquecidos a 100°C durante quatro minutos. Após resfriamento, foram adicionados 250 μ L do tampão fosfato e 250 μ L de fenilhidrazina, permanecendo em repouso durante 10 minutos a temperatura ambiente e durante 5 minutos imersos em gelo. Por último, foi adicionado 1,25 mL de HCl concentrado e 250 μ L de ferricianeto. Após repouso de 15 minutos as leituras foram realizadas em espectrofotômetro a $\lambda= 535$ nm (Espectrofotômetro UV/Visível Ultrospec 2100 pro., Armesham Biosciences). A alantoína foi utilizada como padrão (Vogels e Van Der Drift 1970).

Análise de aminoácidos por cromatografia líquida de alta performance (HPLC)

Os aminoácidos solúveis da seiva de cinco plantas foram separados e analisados por HPLC em coluna de fase reversa como seus derivados OPA (orto- ftaldealdeído), de acordo com o método descrito por Jarret *et al.* (1986). Foi utilizada uma coluna Spherisorb ODS-2 C18 para a eluição em um gradiente linear formado pelas soluções de metanol 65% e tampão fosfato pH 7,5 (50 mM de acetato de sódio, 50 mM de fosfato disódico, 1,5 mL de ácido acético, 20 mL de tetraidrofurano, 20 mL de metanol) num fluxo de 0,8 mL/min. O fluído da coluna foi monitorado por um detector fluorescente Shimadzu (model RF350) operando em

$\lambda=250$ nm (excitação) e $\lambda= 480$ nm (emissão). Os aminoácidos foram derivatizados utilizando-se 20 μ L da amostra e 40 μ L do reagente OPA (orto- ftaldealdeído). Após 2 minutos foram injetados 20 μ L das amostras no aparelho de HPLC.

Delineamento experimental

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com quatro tratamentos de fertilização e quinze repetições. Os dados foram submetidos aos testes de normalidade de Lilliefors e homocedasticidade de Levene. Posteriormente, os dados foram submetidos à análise de variância (Anova One Way) e ao teste de separação de médias Duncan ($p\geq 0,05$). O programa estatístico utilizado foi o Statistica 7.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Crescimento

Plantas de *Inga macrophylla* apresentaram maior investimento em altura e diâmetro quando fertilizadas com NH_4^+ e NO_3^- nas concentrações de 5 mM, não havendo diferença entre as duas formas de N mineral (Fig. 1A e B). As plantas fertilizadas com NH_4^+ e NO_3^- começaram a exibir diferença em altura e diâmetro das plantas que não receberam fertilização nitrogenada a partir dos 45 dias de experimentação como indicado pelas setas no gráfico, atingindo valor final em altura e diâmetro cerca de 24% superior (Fig. 1A).

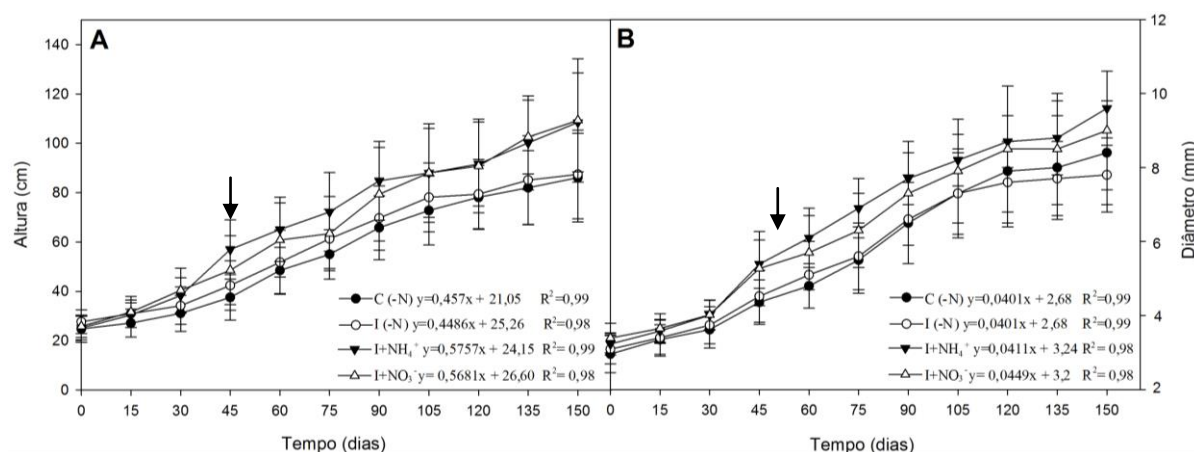


Figura 1: Crescimento em altura (cm) (A) e diâmetro (mm) (B) de plantas jovens noduladas e não noduladas de *Inga macrophylla* recebendo solução nutritiva sem nitrogênio mineral (-N) e contendo 5 mM de amônio (NH_4^+) ou nitrato (NO_3^-) durante 150 dias ($n=15$).

As taxas de crescimento absoluto (TCA-a) e relativo (TCR-a) em altura variaram entre 0,44 a 0,60 cm dia^{-1} e 0,0082 a 0,01 $\text{cm cm}^{-1} \text{dia}^{-1}$, respectivamente, ao passo que as taxas de crescimento absoluto (TCA-d) e relativo (TCR-d) em diâmetro variaram de 0,034 a 0,01 mm dia^{-1} e 0,0066 e 0,0078 $\text{mm mm}^{-1} \text{dia}^{-1}$ (Fig. 2A e B). Verificou-se que tanto a fertilização com NH_4^+ quanto NO_3^- promoveram as maiores taxas de crescimento absoluto e relativo em altura comparado com demais tratamentos. Por outro lado, o crescimento absoluto e relativo em diâmetro foi maior em plantas fertilizadas com NH_4^+ .

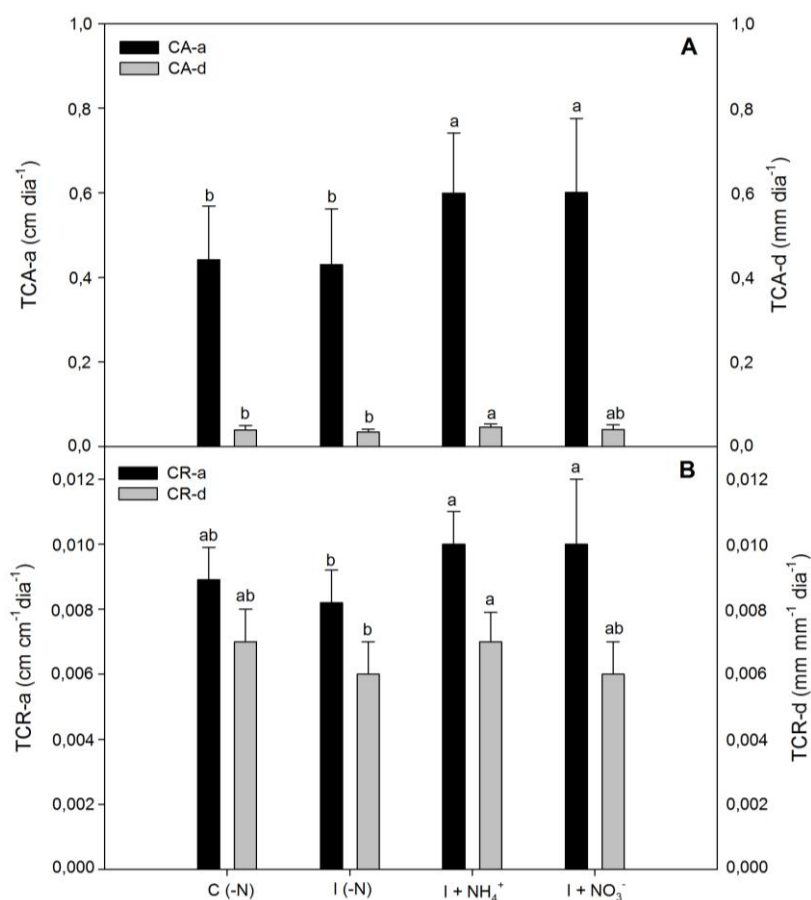


Figura 2: Taxa de crescimento relativo (TCR) (A) e absoluto (TCA) (B) em altura e diâmetro de plantas jovens noduladas e não noduladas de *Inga macrophylla* recebendo solução nutritiva sem nitrogênio mineral (-N) e contendo 5 mM de amônio (NH₄⁺) ou nitrato (NO₃⁻). Os valores são médias e as linhas verticais os desvios-padrão. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan ($p \geq 0,05$) ($n=5$).

O ingresso adicional de N na forma mineral resultou em diferentes estratégias no uso do N nas plantas de *I. macrophylla* no que diz respeito as repostas de crescimento. Apesar dos melhores resultados de crescimento terem sido em plantas fertilizadas com NH₄⁺, as plantas responderam bem ao fornecimento de NO₃⁻. Neste sentido, a espécie tem a capacidade de usar o N mineral nas duas formas sugerindo boa plasticidade mediante as diferentes condições ambientais. Enquanto que o crescimento de plantas dependentes apenas da FBN foi limitado em relação às plantas fertilizadas com N mineral.

Resultado similar foi obtido por plantas jovens noduladas de *Inga marginata*, as repostas de crescimento em altura e diâmetro não diferiram entre as duas formas de N

mineral (NH_4^+ e NO_3^-) e das diferentes quantidades de N fornecidas (5 e 10 mg N/planta/semana) durante 98 dias (Gonçalves *et al.* 1999). Enquanto que a espécie *Inga edulis* fertilizada com NH_4^+ e NO_3^- (5 mM) em solução nutritiva durante 98 dias obteve as maiores taxas de crescimento relativo em altura sob o fornecimento de NH_4^+ , porém, não foram observadas diferenças entre as formas de N mineral quanto ao crescimento relativo em diâmetro (Omena-Garcia *et al.* 2015).

Morfologia foliar

Com relação à morfologia foliar observou-se que a fertilização com N mineral promoveu aumento na área foliar média (AFM), refletindo nos resultados de área foliar total (AFT) (Tabela 1). Plantas do tratamento I+ NH_4^+ apresentaram valores de AFM 46 e 68% superiores aos do tratamento I (-N) e C (-N), respectivamente, enquanto que, para a AFT corresponderam a 51 e 66%, para os mesmos tratamentos, respectivamente (Tabela 1). Não houve diferença entre os tratamentos no que diz respeito aos valores de área foliar específica (AFE).

Tabela 1: Área foliar média (AFM), área foliar total (AFT) e área foliar específica (AFE) de plantas jovens noduladas e não noduladas de *Inga macrophylla* recebendo solução nutritiva sem nitrogênio mineral (-N) e contendo 5 mM de amônio (NH_4^+) ou nitrato (NO_3^-). Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan ($p \geq 0,05$) ($n=5$).

Tratamento	AFM (cm^2)	AFT (cm^2)	AFE ($\text{cm}^2 \text{ g}^{-1}$)
C (-N)	212 ± 131 b	1701 ± 1109 c	247 ± 59 a
I (-N)	362 ± 160 b	2444 ± 846 bc	275 ± 55 a
I+ NH_4^+	662 ± 301 a	4949 ± 1311 a	284 ± 53 a
I+ NO_3^-	480 ± 195 ab	3552 ± 659 b	261 ± 62 a

Estudo em plantas fertilizadas com N mineral demonstrou maior investimento nos compartimentos acima do solo (Chen *et al.* 2013). Esses resultados corroboram com os dados de expansão foliar exibidos nesta pesquisa nas plantas do tratamento I+ NH_4^+ . O investimento em área foliar favorece a captura de recursos primários como a luz o que pode resultar no aumento do crescimento das plantas, como outros fatores físicos relacionados ao ambiente de crescimento das plantas em condições adequadas para a espécie. O favorecimento de

captação de energia proporciona maior síntese de esqueletos de carbono destinados à assimilação do NH_4^+ e, desta forma, maiores quantidades de N são disponibilizadas para as plantas, bem como maior alocação de carbono em todas as partes das plantas (Ariz *et al.* 2011).

A presença ou ausência de N mineral não influenciou na AFE. A razão entre a superfície de captura de luz pela massa foliar é influenciada por fatores ambientais como a luz e a disponibilidade de nutrientes (Messier *et al.* 2010; Laliberté *et al.* 2012). A ausência de diferença entre os tratamentos de fertilização neste trabalho pode ser justificada devido ao crescimento das plantas sob as mesmas condições de luminosidade e por não apresentarem diferenças entre os teores foliares de N e fósforo (P) (Tabela 2). Resultado similar foi obtido pela espécie *Inga edulis* sob o fornecimento de NH_4^+ e NO_3^- (5 mM). Nesta pesquisa, os valores de AFE são atribuídos as mesmas condições ambientais que as plantas estavam submetidas e por serem supridas com os demais nutrientes (Souza *et al.* 2012).

Partição de massa seca

A fertilização com N mineral resultou em uma mudança notável no acúmulo e partição de massa seca entre as partes das plantas. O acúmulo de massa seca foliar, caulinar e radicular foi influenciado positivamente pela fertilização nitrogenada (Fig. 3). Plantas do tratamento $\text{I}+\text{NH}_4^+$ apresentaram acúmulo de massa seca total e foliar cerca de 103 e 127% maior em relação as plantas dos tratamentos C (-N) e I (-N), respectivamente. Quanto aos valores de massa seca caulinar e radicular não observou-se diferença entre plantas dos tratamentos $\text{I}+\text{NH}_4^+$ e $\text{I}+\text{NO}_3^-$. Ao mesmo tempo, as plantas fertilizadas com N mineral, em ambas as formas, exibiram valores de massa seca caulinar e radicular 50% maior quando comparada com as plantas dos tratamentos C(-N) e I (-N). A fertilização com NO_3^- favoreceu o acúmulo de massa seca dos nódulos.

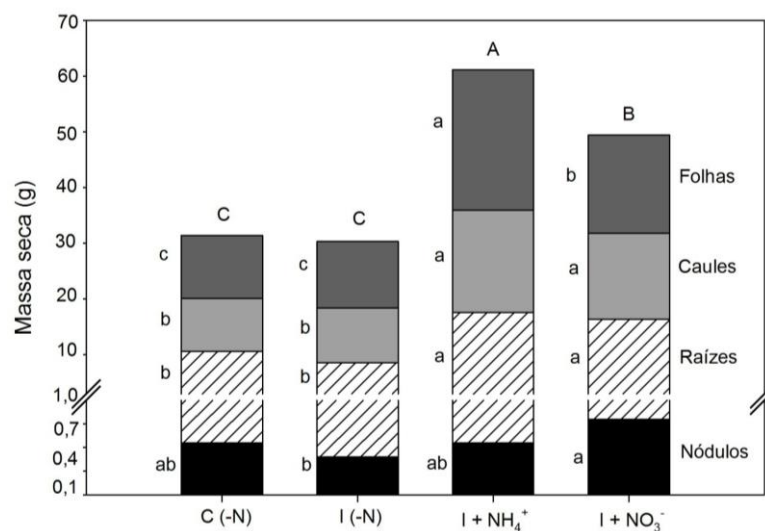


Figura 3: Acúmulo de massa seca total, foliar, caulinar, radicular e dos nódulos de plantas jovens noduladas e não noduladas de *Inga macrophylla* recebendo solução nutritiva sem nitrogênio mineral (-N) e contendo 5 mM de amônio (NH₄⁺) ou nitrato (NO₃⁻). As letras minúsculas comparam o acúmulo de massa seca de cada parte da planta entre os tratamentos de fertilização e as letras maiúsculas o acúmulo de massa seca total. Médias seguidas da mesma não diferem entre si pelo teste de Duncan ($p \geq 0,05$) ($n=15$).

Estudos sobre as relações entre crescimento e fertilização nitrogenada quase sempre tem demonstrado grande correspondência sobre o ganho de biomassa e o aumento do teor de N (Li *et al.* 2012; Uscola *et al.* 2014; Otuba e Weih 2015). O maior acúmulo de massa seca total em *I. macrophylla* corresponde às variáveis de crescimento, nas quais plantas fertilizadas com NH₄⁺ e NO₃⁻ tiveram maiores valores em altura e diâmetro. O maior incremento em diâmetro resultou no maior acúmulo de massa seca do caule em plantas fertilizadas com NH₄⁺. O investimento em massa seca das raízes pode ser consequência do aumento do fornecimento de carboidratos para essa parte da planta neste tratamento uma vez que a assimilação de NH₄⁺ ocorre basicamente nas raízes (Hirel *et al.* 2011). Enquanto que o aumento em massa seca foliar está relacionado com a expansão de área foliar, corroborando com os maiores valores em área foliar média e total (Tabela 1).

A espécie *Inga edulis* obteve no maior acúmulo de massa seca total sob a fertilização com NH₄⁺ (5 mM) (Omena-Garcia *et al.* 2011). As melhores respostas nesse tratamento foram associadas aos maiores teores de N que contribuíram para o aumento das taxas fotossintéticas permitindo o maior fornecimento de carbono para o crescimento e acúmulo de massa seca total das plantas. Neste caso, a preferência pelo NH₄⁺ pode estar relacionada às

maiores concentrações desse íon no habitat natural dessa espécie (Wick *et al.* 2005; Omena-Garcia *et al.* 2011; Souza *et al.* 2012). A espécie *Inga marginata* obteve o maior acúmulo de massa seca de folhas, raízes e nódulos sob o fornecimento de NH_4^+ (5 e 10 mg N/planta/semana) (Gonçalves *et al.* 1999). Em contrapartida, a espécie *Lonchocarpus muehlbergianus* não apresentou diferenças no acúmulo de massa seca total e nas proporções no acúmulo de massa seca de folhas, raízes e nódulos ao receber NO_3^- em duas concentrações (7,5 e 22,5 mM) em solução nutritiva durante 20 dias de experimentação (Moreira *et al.* 2014).

Muitas espécies de plantas têm exibido maior crescimento e acúmulo de biomassa quando fertilizadas com alguma forma de N mineral, no entanto, as razões que levam a preferência por uma das formas ainda não são completamente conhecidas. Assim, fatores relacionados às condições experimentais, ambientais e genéticos devem ser considerados com a finalidade de buscar o entendimento mais completo a cerca desse tema (Boudsocq *et al.* 2012; Brito e Kronzucker 2013).

A preferência por determinada forma de N mineral pode estar relacionada a outros fatores como a melhor adaptação de algumas espécies em solos com maior quantidade de uma das formas de N mineral (Brito e Kronzucker 2013). A concentração de cada nutriente no solo são influenciados pelos valores de pH que interferem diretamente na atividade das bactérias presentes no solo que mineralizam a matéria orgânica (Hawkins e Robbins 2010).

Outro fator é referente à classe sucessional uma vez que espécies pioneiras, de crescimento rápido têm maior capacidade fotossintética e um menor tempo de vida em comparação com as espécies secundárias, sendo observada maior absorção de NO_3^- que é assimilado na parte aérea das árvores, enquanto que espécies clímax absorvem preferencialmente o NH_4^+ que são assimilados nas raízes (Stewart *et al.* 1988; Stewart 1991; Warren *et al.* 2009; Helali *et al.* 2010).

O custo energético para a assimilação das formas minerais tem sido considerado, haja vista que o metabolismo do NO_3^- consome 23% de energia enquanto que o NH_4^+ exige apenas 14%, uma vez que este último é diretamente assimilado em aminoácidos (Bloom *et al.* 1992; Martínez-Andujar *et al.* 2013). No entanto, a presença do NH_4^+ em grandes quantidades pode causar toxicidade nas plantas e o processo de detoxicação causada pela absorção excessiva de NH_4^+ também consome energia (Von Wiren e Merrick 2004). Desta maneira, a natureza prejudicial do NH_4^+ exige sua rápida assimilação, evitando acúmulo nos tecidos vegetais. Para esse fim, os tecidos possuem um eficiente sistema de assimilação que

funciona em baixas concentrações de NH_4^+ (Holzschuh *et al.* 2011). Nesta pesquisa, considerando a concentração fornecida não foi constatado nenhum efeito prejudicial para o crescimento e acúmulo de massa seca das plantas.

Número e peso específico dos nódulos

Todas as plantas de *I. macrophylla* nodularam, tendo melhor desempenho as plantas do tratamento C (-N) que apresentaram em média 425 nódulos e as fertilizadas com $\text{I}+\text{NO}_3^-$ cerca de 464 nódulos, ao passo que, sob fertilização com $\text{I}+\text{NH}_4^+$ foi observada redução do número de nódulos, em torno de 124 nódulos (Fig. 4A). O maior número de nódulos em plantas do tratamento $\text{I}+\text{NO}_3^-$ possibilitou o maior investimento em massa seca dos nódulos (Fig. 3). Entretanto, mesmo com a redução do número de nódulos nas plantas sob fertilização $\text{I}+\text{NH}_4^+$, proporcionou o acúmulo de massa seca dos nódulos similar às plantas do tratamento C (-N). Isto ocorreu devido às diferenças morfológicas dos nódulos mediante aos tratamentos de fertilização, uma vez que o tamanho, representado pela variável peso específico dos nódulos foram 3 vezes superiores aos dos demais tratamentos (Fig. 4B).

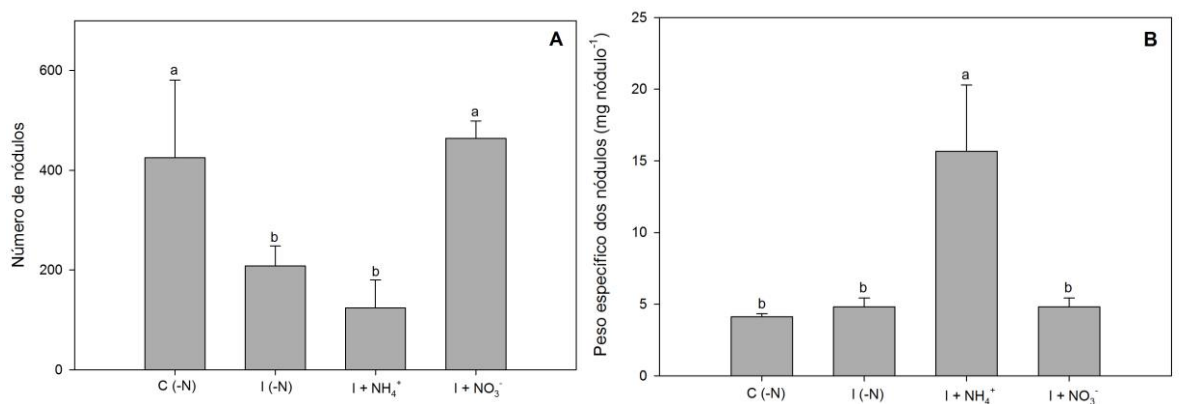


Figura 4: Número (A) e peso específico dos nódulos (B) de plantas jovens noduladas e não noduladas de *Inga macrophylla* recebendo solução nutritiva sem nitrogênio mineral (-N) e contendo 5 mM de amônio (NH_4^+) ou nitrato (NO_3^-). Os valores são médias e as linhas verticais os desvios-padrão. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan ($p \geq 0,05$) ($n=5$).

Em espécies de leguminosas, a forma de N pode ter implicações não apenas no crescimento, mas em alterações quanto ao processo simbiótico e em alguns casos, ocorre à inibição total da nodulação e da FBN. Portanto nessas espécies o ideal é encontrar a forma e a

concentração adequada de N que não interfira na FBN e que resulte em um uso eficiente do N e promova o maior crescimento da planta.

A espécie *I. macrophylla* teve melhor desempenho de crescimento sob a forma de NH_4^+ , e mesmo sendo observada uma redução da nodulação neste tratamento, o peso específico dos nódulos foi superior em relação aos de outros tratamentos. Isto pode ter ocorrido devido ao melhor estado das plantas no que se refere ao acúmulo de carbono, em todas as partes das plantas, o que favoreceu também o maior acúmulo de massa seca dos nódulos. As diferenças entre número e peso específicos dos nódulos sugerem que não pode ser afirmado em qual dos tratamentos a forma de N mineral foi mais significativa para *I. macrophylla*, uma vez que o maior investimento no peso específicos em nódulos do tratamento $\text{I}+\text{NH}_4^+$ podem ter maior atividade da enzima nitrogenase em relação aos nódulos dos demais tratamentos, sendo então necessário investigar a atividade da enzima nestas condições.

Diferente dos resultados obtidos por *I. macrophylla*, a nodulação da espécie *I. marginata* foi completamente inibida sob o fornecimento de NO_3^- (Gonçalves *et al.* 1999). Neste caso, a inibição da nodulação na presença do NO_3^- pode estar atribuída à tolerância desta espécie a solos ácidos e a capacidade de suportar encharcamento e inundações temporárias, nessas condições, os teores NO_3^- são mínimos, principalmente por serem facilmente lixiviados (Lawrence *et al.* 1995).

A nodulação da espécie *I. edulis* foi favorecida pelo fornecimento de NH_4^+ (5 mM). O aumento da nodulação nesse tratamento correspondeu ao maior crescimento e acúmulo de massa seca, enquanto que sob o fornecimento de NO_3^- na mesma concentração foi verificada redução da nodulação (Omena-Garcia *et al.* 2011). Em contrapartida, a espécie *Lonchocarpus muehlbergianus* não teve a nodulação reduzida ao receber NO_3^- em duas concentrações (7,5 e 22,5 mM) (Moreira *et al.* 2014).

Esses resultados corroboram com os dados encontrados na literatura onde a FBN da maioria das espécies estudadas até agora, apresentaram algum tipo de sensibilidade ao N mineral (Streeter 1998; Glyanko *et al.* 2009; Barron *et al.* 2011). Alguns fatores vêm sendo apontados sobre o efeito negativo da fertilização com N mineral na nodulação. Um deles está relacionado ao maior custo energético para o processo de FBN em relação à redução das formas minerais de N. Neste caso, é mais vantajoso para as plantas absorver as formas de N mineral presentes no solo (Glyanko *et al.* 2009). Adicionalmente, as formas minerais de N ocasionam redução dos compostos fenólicos que são responsáveis pela sinalização entre

bactérias e plantas no solo (Makarova *et al.* 2007). O aumento do fornecimento de NO_3^- ou ainda nas taxas de desnitrificação favorecem a formação de óxido nitroso no solo que influência negativamente a entrada dos rizóbios nas raízes (Pagnussat *et al.* 2002; Zhao *et al.* 2007).

Teores foliares e radiculares de nutrientes

Os teores foliares e radiculares de N variaram de 33,3 a 37,2 g kg^{-1} e 16,6 a 19,7 g kg^{-1} , respectivamente e não foi observada diferença entre os tratamentos de fertilização (Tabela 2). Os teores foliares de N encontram-se na faixa entre 12 e 35 g kg^{-1} que são considerados adequados para o crescimento de espécies florestais (Malavolta *et al.* 1997). Teores foliares de N em plantas não fertilizadas com N mineral foram semelhantes às plantas fertilizadas com NO_3^- e NH_4^+ , o que pode ser explicado devido à contribuição do N proveniente da FBN. Resultado similar foi obtido por plantas de *Inga edulis* onde não foi verificado diferença dos teores foliares de N em plantas não fertilizadas com N mineral e as que receberam NO_3^- e NH_4^+ (5 mM) (Souza *et al.* 2012).

As concentrações adequadas de P (fósforo) para o crescimento das plantas estão na faixa de 2 a 5 g kg^{-1} (Raghothama 1999; Kirkby e Johnsto 2008). Nesta pesquisa, os teores foliares de P variaram de 2,1 a 2,4 g kg^{-1} e não foi observada diferença entre os tratamentos. Nas raízes, os teores de P variaram de 0,9 a 1,3 g kg^{-1} . A concentração de P foi reduzida nas raízes dos tratamentos C(-N) e I+ NO_3^- , o que pode ser resultado da grande demanda exigida para o processo de fixação biológica, visto que os maiores números de nódulos foram nesses dois tratamentos (Fig. 4). O P possui uma função essencial no metabolismo energético das plantas e assim desempenha importante papel na fixação de N_2 , devido à alta demanda por ATP para a atividade da enzima nitrogenase dentro dos nódulos (Divito e Sadras 2014). A grande demanda por P em plantas fixadoras de N_2 também está associada ao desenvolvimento de nódulos e a síntese de fosfolípidos em bacterióides (Graham e Vance 2000; Kleinert *et al.* 2014).

Os teores foliares de K foram superiores nas plantas do tratamento C(-N) (26,6 g kg^{-1}), no entanto, nas raízes, os teores foram reduzidos (16,25 g kg^{-1}), ocorrendo em maiores quantidades nas plantas fertilizadas com NO_3^- (18,9 g kg^{-1}) o que pode estar relacionado com a forma de NO_3^- fornecida nesse tratamento, o nitrato de potássio (KNO_3). De tal forma, os

maiores teores de K neste tratamento pode ter favorecido a absorção do NO_3^- nas raízes, que é do tipo simporte, desta forma o K pode ter atuado como cotransportador.

Os maiores teores de Ca (cálcio) tanto em folhas quanto em raízes, foram observados nas plantas do tratamento C(-N), 15 e 6 g kg^{-1} , respectivamente (Tabela 2). Nas folhas, os teores de Ca variam entre 1 e 50 g kg^{-1} (Marschner 2012). Na FBN, o Ca participa na etapa de infecção das bactérias nas plantas, sendo responsável por processos de transdução de sinais (Oldroyd e Downie 2006). Desta forma, altas ofertas de Ca promovem o aumento da fixação e do número de nódulos, corroborando com o maior número de nódulos obtidos no tratamento C (-N). Os baixos teores de Ca em plantas do tratamento I+ NH_4^+ podem estar relacionados com a maior absorção do NH_4^+ (Vitti *et al.* 2006).

Os teores de Mg (magnésio) nas raízes foram favorecidos pela fertilização com I+ NH_4^+ e NO_3^- , 26,4 e 26,5 g kg^{-1} , respectivamente. Nas folhas, os maiores teores foram em plantas dos tratamentos C(-N) e I+ NH_4^+ , 6,2 e 6,3 g kg^{-1} , respectivamente. Nesse caso, observamos que a fertilização com NH_4^+ não reduziu os teores de Mg, uma vez que a presença do NH_4^+ no meio em grandes quantidades pode ocasionar diminuição de pH, interferindo na disponibilidade deste íon (Vitti *et al.* 2006).

As formas de N mineral podem resultar em absorção diferenciada dos demais nutrientes, variando de acordo com as condições do solo e da espécie (Helali *et al.* 2010; Uscola *et al.* 2014). Em folhas de *Aniba roseadora* fertilizadas com NO_3^- : NH_4^+ em diferentes proporções, os teores de Ca e Mg não diferiram entre os tratamentos. Nas raízes, o maior teor de Ca foi no tratamento 100:0 de%. Enquanto que os teores de K não diferiram em folhas, porém nas raízes os maiores valores foram verificados nos tratamentos 72:25% e 100:0% (Barreto *et al.* 2007). Nas espécies *Senna multijuga* e *Jacaranda mimosaeifolia* a fertilização com NO_3^- favoreceu o maior acúmulo de Ca e K em comparação as plantas fertilizadas com NH_4^+ (Pereira *et al.* 1996). A maior absorção de cátions em plantas fertilizadas com NO_3^- está relacionada com a maior competição entre cátions na absorção e com a necessidade do balanço de cargas na planta (Uscola *et al.* 2014).

Tabela 2: Teores foliares e radiculares de nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca) e magnésio (Mg) e de plantas jovens noduladas e não noduladas de *Inga macrophylla* recebendo solução nutritiva sem nitrogênio mineral (-N) e contendo 5 mM de amônio (NH₄⁺) ou nitrato (NO₃⁻). Os valores são médias±desvio-padrão. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan ($p \geq 0,05$) ($n=5$).

Parte da planta	Tratamentos	Macronutrientes				
		g/kg				
		N	P	K	Ca	Mg
Folhas	C (-N)	33,3 ± 0,2 a	2,1 ± 0,4 a	26,6 ± 2,5 a	15 ± 0,7 a	6,2 ± 0,2 a
	I (-N)	37,2 ± 0,2 a	2,2 ± 0,3 a	21,1 ± 2,6 b	8 ± 0,9 c	4,5 ± 0,3 c
	I+ NH ₄ ⁺	35,9 ± 0,4 a	2,1 ± 0,4 a	18,6 ± 1,6 b	10 ± 0,2 b	6,3 ± 0,1 a
	I+ NO ₃ ⁻	37,4 ± 0,3 a	2,4 ± 0,4 a	19,9 ± 1,9 b	9,2 ± 0,7 bc	5,3 ± 0,2 b
Raízes	C (-N)	19,7 ± 0,5 a	0,9 ± 0,3 b	16,3 ± 1,4 b	6 ± 1,4 a	15,5 ± 1,0 b
	I (-N)	19,5 ± 0,1 a	1,3 ± 0,2 a	17,3 ± 1,1 b	5,3 ± 0,8 ab	14,4 ± 2,2 b
	I+ NH ₄ ⁺	16,6 ± 0,2 a	1,3 ± 0,3 a	16,6 ± 1,2 b	4,7 ± 0,5 b	26,4 ± 1,9 a
	I+ NO ₃ ⁻	18,7 ± 0,2 a	0,9 ± 0,2 b	18,9 ± 0,9 a	5,2 ± 0,5 ab	26,5 ± 3,2 a

Quanto aos micronutrientes, verificou-se que os teores de Fe (ferro), nas folhas foram superiores nas plantas fertilizadas com NH₄⁺, enquanto que nas raízes não diferiu em ambas as formas de N mineral (Tabela 3). O Fe é essencial para a espécie de leguminosa no que tange a fixação do nitrogênio por ser componente da enzima nitrogenase, participando do transporte de elétrons da ferredoxina, na proteína leghemoglobina e nas hidrogenases (Abdelmajid *et al.* 2008). Apesar das concentrações de Fe para o crescimento adequado das plantas estarem na faixa de 50 e 100 mg kg⁻¹, observou-se que plantas de *I. macrophylla* apresentaram teores bastante elevados. Contudo, não foram verificados sintomas de toxicidade, uma vez que o crescimento das plantas não foi afetado.

Nas folhas, os teores de Zn (zinco) foram superiores nas plantas do tratamento I+NH₄⁺ (16,2 mg Kg⁻¹), enquanto que nas raízes, o maior acúmulo foi no tratamento I (-N) (64,5 mg Kg⁻¹). Quanto aos teores de Mn (manganês), não foi verificado diferença entre os teores quanto ao fornecimento ou não de NH₄⁺, visto que plantas dos tratamentos I+NH₄⁺ e I(-N) apresentaram os maiores valores. Ao passo que nas raízes, os maiores teores foram sob a fertilização I+NO₃⁻ (Tabela 3). Em *Aniba* roseadora, os teores de Fe tanto em folhas quanto em raízes não diferiram entre as diferentes proporções de NO₃⁻ e NH₄⁺. Enquanto que os teores de Zn, em folhas foram maiores no tratamento 100: 0% NO₃⁻: NH₄⁺. Para Mn não houve diferença entre os teores presentes nas folhas dos tratamentos testados. No entanto, nas

raízes os teores mais elevados foram no tratamento com 75: 25% de NO_3^- : NH_4^+ (Barreto *et al.* 2007).

A absorção diferenciada de cátions e ânions varia em função do pH da rizosfera que influencia na disponibilidade de outros nutrientes para as plantas (Ortiz-Ramirez *et al.* 2011). No caso de plantas que absorvem NO_3^- , tem sido observado a necessidade de absorver cátions devido ao balaço de cargas (Hageman 1984). A acidificação da rizosfera pode ocorrer devido ao excesso de absorção de cátions que neste caso é balanceado pela liberação de prótons como ocorre com o mecanismo de transporte tipo simporte do NO_3^- na membrana, havendo liberação de 2 H^+ . Enquanto que o excesso de absorção de ânions em relação aos de cátions resulta no aumento no pH da rizosfera mediante a remoção de prótons (Ortiz-Ramirez *et al.* 2011).

Tabela 3: Teores foliares e radiculares de ferro (Fe), zinco (Zn), cobre (Cu) e manganês (Mn) de plantas jovens noduladas e não noduladas de *Inga macrophylla* recebendo solução nutritiva sem nitrogênio mineral (-N) e contendo 5 mM de amônio (NH_4^+) ou nitrato (NO_3^-). Os valores são médias±desvio-padrão. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan ($p \geq 0,05$) ($n=5$).

Parte da planta	Tratamentos	Micronutrientes		
		mg/kg		
		Fe	Zn	Mn
Folhas	C (-N)	124,7 ± 11,5 ab	10,2 ± 1,8 b	219,9 ± 42,4 b
	I (-N)	122,2 ± 16,6 ab	9,9 ± 1,8 b	318,9 ± 25,7 a
	I+ NH_4^+	139,3 ± 4,7 a	16,2 ± 4,4 a	331,7 ± 18,6 a
	I+ NO_3^-	114,8 ± 6,7 b	13 ± 2,6 ab	184,5 ± 20,2 b
Raízes	C (-N)	275,4 ± 42,8 c	33,2 ± 7,9 b	134,1 ± 11,3 c
	I (-N)	377,2 ± 46,1 b	64,5 ± 5,9 a	94,3 ± 18,7 c
	I+ NH_4^+	587,7 ± 44,4 a	25,6 ± 5,6 b	253,0 ± 30,9 b
	I+ NO_3^-	605,1 ± 57,8 a	28,5 ± 4,4 b	345,7 ± 36,3 a

Teores de pigmentos cloroplastídicos e fluorescência da clorofila a

Plantas de *I. macrophylla* tiveram maior investimento de Chl *a*, Chl *b*, C_{x+c} , Chl_{total} na condição de I+ NO_3^- (Tabela 4). Em contrapartida, não houve diferença entre os tratamentos quanto a razão Chl *a* /Chl *b*. Plantas I (-N) exibiram maior razão $\text{Chl}_{total} / \text{C}_{x+c}$. Verificou-se que plantas I+ NH_4^+ apresentaram número reduzido de Chl_{total} semelhantes aos resultados

obtidos em plantas C (-N). Os diferentes investimentos em moléculas de clorofilas bem como as formas de N mineral não afetaram o transporte de elétrons na etapa fotoquímica, uma vez que não foram verificadas diferenças entre os tratamentos quanto as variáveis F_v/F_m , PI_{ABS} e PI_{total} (Tabela 4).

Tabela 4: Teores de pigmentos cloroplastídicos na base da massa ($\mu\text{mol/g}$), rendimento quântico máximo do PSII (F_v/F_m), índice de desempenho (PI_{ABS}) e índice de desempenho total (PI_{total}) de plantas jovens noduladas não noduladas de *Inga macrophylla* recebendo solução nutritiva sem nitrogênio mineral (-N) e contendo 5 mM de amônio (NH_4^+) ou nitrato (NO_3^-). Os valores são médias \pm desvio-padrão. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan ($p \geq 0,05$) ($n=5$).

Variáveis	C (-N)	I (-N)	I + NH_4^+	I + NO_3^-
Chl <i>a</i>	1,4 \pm 0,4 b	1,7 \pm 0,4 ab	1,2 \pm 0,9 b	2,3 \pm 0,3 a
Chl <i>b</i>	0,5 \pm 0,1 b	0,6 \pm 0,1 b	0,6 \pm 0,3 b	0,8 \pm 0,1 a
C_{x+c}	0,5 \pm 0,1 b	0,5 \pm 0,1 b	0,4 \pm 0,2 b	0,9 \pm 0,1 a
Chl <i>a</i> /Chl <i>b</i>	2,9 \pm 0,3 a	2,9 \pm 0,1 a	2,3 \pm 1,2 a	2,8 \pm 0,04 a
Chl_{total}	1,9 \pm 0,5 b	2,3 \pm 0,5 ab	1,7 \pm 1,1 b	3,1 \pm 0,5 a
Chl_{total} / C_{x+c}	3,9 \pm 0,4 ab	4,3 \pm 0,4 a	4,2 \pm 0,6 ab	3,7 \pm 0,1 ab
F_v/F_m	0,8 \pm 0,01 a	0,8 \pm 0,01 a	0,8 \pm 0,003 a	0,8 \pm 0,01 a
PI_{ABS}	1,2 \pm 0,3 a	1,2 \pm 0,2 a	1,2 \pm 0,3 a	1,5 \pm 0,2 a
PI_{total}	0,9 \pm 0,2 a	0,7 \pm 0,1 a	0,7 \pm 0,2 a	1,0 \pm 0,3 a

As clorofilas são essenciais para a transformação da energia luminosa em energia química e por essa razão, são estreitamente relacionadas com a eficiência fotossintética das plantas, e conseqüentemente, ao seu crescimento e estabelecimento em diferentes ambientes de luz, água e nutrientes (Marenco e Lopes 2009). A relação entre o investimento de moléculas de clorofilas para melhor absorção e uso da energia luminosa sob o fornecimento de diferentes formas de N foi observada para a espécie *Inga edulis*, na qual os maiores teores de Chl *a*, Chl *b*, C_{x+c} e Chl_{total} foi sob o fornecimento de NH_4^+ (5 mM) (Souza *et al.* 2012). O maior investimento em moléculas de clorofilas no tratamento com NH_4^+ possibilitou maior capacidade de absorção de fótons com reflexos diretos sobre o ganho em carbono, quando comparados com os demais tratamentos. Em relação aos parâmetros de fluorescência em *I. edulis* não foi verificada diferença, o que pode ser atribuído aos teores foliares de N que não diferiram entre plantas fertilizadas com N mineral e as dependentes apenas da FBN.

Em plantas de *I. macrophylla*, mesmo não sendo observada diferenças entre as taxas fotossintéticas (Tabela 5), sugere-se que o maior investimento em pigmentos cloroplastídicos em plantas do tratamento I+NO₃⁻ pode ser estratégia utilizada pelas plantas de tal forma que pudessem conciliar a absorção e o uso da energia luminosa com a energia destinada para a redução do NO₃⁻ a NO₂⁻, uma vez que, este processo exige elevado custo energético, bem como para a assimilação do carbono. Contudo, os diferentes investimentos de moléculas de clorofilas por tratamento contribuíram para melhor aclimatação das plantas corroborando com os dados de fluorescência da clorofila *a* (Tabela 4).

Outro fator que pode ter favorecido o bom desempenho de plantas em todos os tratamentos, incluindo os de plantas que não receberam N mineral, foi o fornecimento da solução nutritiva com macro e micronutrientes e a irrigação diária em condições moderadas de luz. Adicionalmente, os teores de foliares de N que não diferiram entre os tratamentos favoreceram tanto a capacidade de absorção de luz, quanto no transporte de elétrons na membrana dos tilacóides assim como reportado em outros trabalhos (Nikiforou e Manetas, 2011; Zivcak *et al.* 2014).

Trocas gasosas

Os valores de assimilação de CO₂ em função do aumento da irradiância exibiram comportamento diferenciado entre os tratamentos (Fig. 5). Os maiores valores de P_N foram em plantas do tratamento C(-N) a partir da irradiância de 500 μmol m⁻²s⁻¹. Nesse ponto, os tratamentos I (-N) e I+NO₃⁻ apresentaram comportamento similar até os maiores valores de irradiância (2000 μmol m⁻²s⁻¹), enquanto que plantas do tratamento I+NH₄⁺ tiveram desempenho inferior, apresentando valores cerca de 25% menor em todos os pontos em relação as plantas do C (-N).

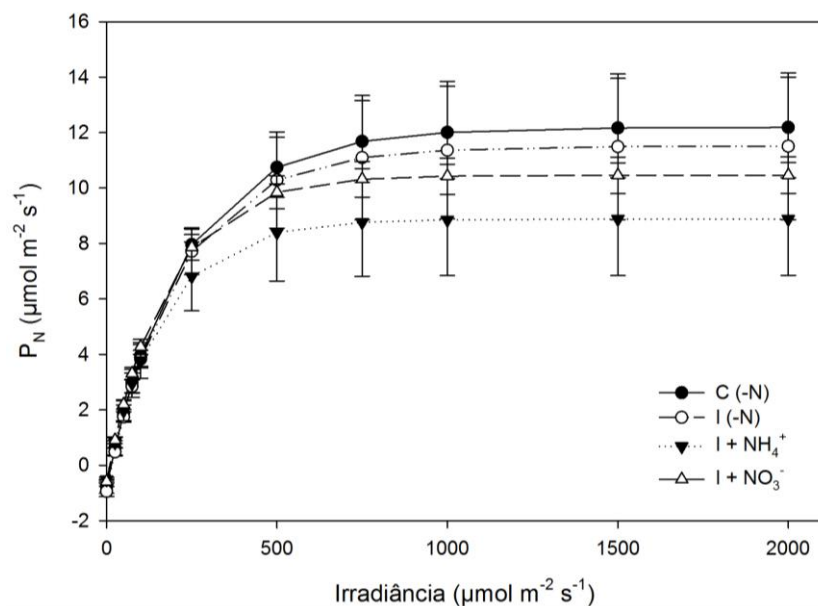


Figura 5: Curva resposta da fotossíntese (P_N) em função do aumento da irradiância de plantas jovens noduladas e não noduladas de *Inga macrophylla* recebendo solução nutritiva sem nitrogênio mineral (-N) e contendo 5 mM de amônio (NH_4^+) ou nitrato (NO_3^-). As linhas representam o ajuste dos dados utilizando o modelo exponencial. As barras verticais representam o desvio-padrão.

Não foram observadas diferenças quanto aos valores de fotossíntese máxima ($P_{N\text{max}}$), rendimento quântico (α), irradiância de saturação (I_s) e transpiração (E) (Tabela 5). Entretanto, observou-se que os valores de R_d de plantas do tratamento $\text{I}+\text{NH}_4^+$ foi 84% inferior em relação às plantas do tratamento I (-N), o que resultou nos menores valores de irradiância de compensação (I_c) que foi cerca de 89% inferior em relação a esse mesmo tratamento I (-N). Para g_{s2000} , verificou-se que as plantas $\text{I}+\text{NO}_3^-$ exibiram valores cerca de 4 vezes maiores do que em plantas do tratamento $\text{I}+\text{NH}_4^+$.

Tabela 5: Características fotossintéticas de plantas jovens noduladas e não noduladas de *Inga macrophylla* recebendo solução nutritiva sem nitrogênio mineral (-N) e contendo 5 mM de amônio (NH_4^+) ou nitrato (NO_3^-). Fotossíntese máxima ($P_{N_{\max}}$), respiração no escuro (R_d), rendimento quântico (α), irradiância de compensação (I_c), irradiância de saturação (I_s), condutância estomática (g_{s2000}), transpiração (E_{2000}). Os valores são médias \pm desvio-padrão. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan ($p \geq 0,05$) ($n=5$).

Variáveis	Unidade	C (-N)	I (-N)	I + NH_4^+	I + NO_3^-
$P_{N_{\max}}$	$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	12,8 \pm 1,9 a	12,2 \pm 2,9 a	10,5 \pm 1,4 a	11,9 \pm 1,4 a
R_d	$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	0,8 \pm 0,2 ab	0,9 \pm 0,1 a	0,5 \pm 0,1 b	0,6 \pm 0,06 b
α	$\text{mol CO}_2 \text{ mol quanta}^{-1}$	0,1 \pm 0,01 a	0,1 \pm 0,01 a	0,04 \pm 0,02 a	0,06 \pm 0,002 a
I_c	$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	13,4 \pm 4,4 ab	15,9 \pm 1,4a	8,4 \pm 1,4 c	9,2 \pm 1,3 bc
I_s	$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	524 \pm 114 a	517 \pm 158 a	400 \pm 57 a	406 \pm 7,4 a
g_{s2000}	$\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	350 \pm 130 ab	450 \pm 130 ab	150 \pm 5 b	580 \pm 40 a
E_{2000}	$\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	4,2 \pm 0,5 ab	4,9 \pm 0,9 a	2,9 \pm 0,9 b	4,8 \pm 1,6 a

Independente da forma de N, não houve diferença nas taxas fotossintéticas entre os tratamentos de fertilização. Os menores valores de $P_{N_{\max}}$ em plantas do tratamento I+ NH_4^+ são atribuídos aos menores valores g_s . A redução dos valores de g_s pode ser estratégia utilizada para minimizar a perda de água visto que os valores de E_{2000} obtidos em plantas do tratamento I+ NH_4^+ foram cerca de 68% menor em relação às plantas do tratamento I(-N) que obteve os maiores valores. Isto pode ter afetado os valores de fotossíntese por unidade de área das plantas do tratamento I+ NH_4^+ e contribuir para os menores valores de I_c . Por outro lado, o maior investimento em área foliar total das plantas do tratamento I+ NH_4^+ contribuiu para maior produtividade destas plantas, decorrente da maior atividade fotossintética por área foliar total neste tratamento, o que resultou no maior crescimento e acúmulo de massa seca das plantas.

O fato de algumas espécies apresentarem maior assimilação de carbono em plantas fertilizadas com NH_4^+ pode estar relacionado à taxa de regeneração da Rubisco, uma vez que o NH_4^+ pode causar maior taxa de regeneração da RuBP quando comparado com outras formas de N (Guo *et al.* 2007). Isto ocorre devido à rápida assimilação do NH_4^+ em aminoácidos, enquanto que o NO_3^- precisa primeiramente ser reduzida a NO_2^- e posteriormente a NH_4^+ . Este processo interfere diretamente no consumo de NADPH, pois, grande porção dos produtos da cadeia transportadora de elétrons pode ser usada para a

assimilação de NO_3^- a NO_2^- (Downie 2005). O custo de foto energia para a assimilação de NH_4^+ é cerca de 45% inferior em relação ao NO_3^- (Raven 1985).

Quanto às taxas fotossintéticas de plantas não fertilizadas com N mineral serem similares as de plantas fertilizadas com NH_4^+ e NO_3^- pode estar relacionado à maior fixação do N_2 , visto que esse processo demanda de grande disponibilidade de fotoassimilados. Em estudo com soja essa relação foi observada, uma vez que plantas sob o fornecimento de NO_3^- apresentaram taxas fotossintéticas inferiores em relação às plantas dependentes da FBN (Kaschuk *et al.* 2009). Isso é reflexo das altas taxas de respiração em plantas dependendo da FBN em plantas do tratamento C (-N) e I (-N) que destinaram maior energia para o processo simbiótico, o que resultou no menor investimento em biomassa. Por outro lado, plantas dos tratamentos I+ NH_4^+ e I+ NO_3^- adotaram outras estratégias de modo que menores quantidades de carboidratos foram consumidas o que ocasionou o maior acúmulo e alocação de biomassa nas diferentes partes das plantas.

Em comparação, as respostas fotossintéticas das espécies *I. edulis* com *Dipteryx odorata* crescendo em área degradada próximo a hidrelétrica de Balbina, sem receber nenhum tipo de fertilização, a espécie *I. edulis* obteve valor de P_N cerca de 59% superior em relação a *Dipteryx odorata*, contudo, não foi verificada relação entre crescimento e com a assimilação de carbono nessa condição (Jaquetti *et al.* 2014). Tal fato corrobora com os dados obtidos nesse trabalho com *I. macrophylla* que mesmo apresentando valores de P_N semelhantes entre os tratamentos, a maior parte de energia produzida pode estar sendo destinada para o processo de FBN e não para o acúmulo de biomassa. Porém, quando comparado espécies de *I. edulis* dependendo apenas do processo de FBN com as que receberam fertilização, verificou-se maior crescimento em plantas, acompanhado dos menores valores de respiração nestas condições (Jaquetti *et al.* 2014).

Eficiência fotossintética no uso dos nutrientes

Os tratamentos variaram quanto à eficiência fotossintética no uso dos nutrientes ($\text{EFU}_{\text{Nutriente}}$) (Tabela 6). A maior EFUN foi em plantas fertilizadas com NO_3^- , enquanto que não foi observada diferença entre os tratamentos quanto a EFUP e EFUK. Plantas sob fertilização com NO_3^- e NH_4^+ apresentaram menor eficiência fotossintética dos nutrientes analisados em relação às plantas que não receberam N mineral. Os maiores valores de

EFUCa, EFUMg e EFUZn foram em plantas do tratamento I(-N). Enquanto que a maior EFUFe e EFUMn foram em plantas do tratamento C(-N).

Tabela 6: Eficiência fotossintética no uso de macro e micronutrientes de plantas jovens noduladas e não noduladas de *Inga macrophylla* recebendo solução nutritiva sem nitrogênio mineral (-N) e contendo 5 mM de amônio (NH₄⁺) ou nitrato (NO₃⁻). Os valores são médias±desvio-padrão. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan ($p \geq 0,05$) ($n=5$).

	C (-N)	I (-N)	I+ NH ₄ ⁺	I+ NO ₃ ⁻
	(mmol mol ⁻¹ s ⁻¹)			
EFUN	1855 ± 197 b	1931 ± 65 b	1989 ± 282 b	2271 ± 230 a
EFUP	6161 ± 1534 a	5708 ± 1524 a	5487 ± 495 a	4978 ± 693 a
EFUK	520 ± 80 a	560 ± 70 a	560 ± 50 a	590 ± 80 a
EFUCa	827 ± 162 c	1526 ± 261 a	1112 ± 79 bc	1234 ± 208 ab
EFUMg	2167 ± 152 ab	2384 ± 167 a	1787 ± 158 c	1973 ± 90 bc
EFUFe	114 ± 4,6 a	78 ± 3,3 c	80,3 ± 5 c	103 ± 5,7 b
EFUZn	1270 ± 265 ab	1539 ± 290 a	537 ± 20 c	1007 ± 85 b
EFUMn	63,2 ± 12 a	33,7 ± 3,1 b	31,5 ± 3,1 b	66,8 ± 11,8 b

A eficiência de utilização do nutriente é um importante parâmetro que afeta a sobrevivência e reprodução de plantas bem como a produtividade primária líquida no ecossistema terrestre, sendo então utilizado para avaliar o desempenho fisiológico das espécies (Hidaka e Kitayama 2009; Weih *et al.* 2011).

A EFUN foi superior em plantas do tratamento NO₃⁻, mesmo não havendo diferença nos teores foliares de N e nas taxas fotossintéticas. Este resultado indica maior exigência de N para o processo fotossintético nesse tratamento, fato que pode estar relacionado ao gasto de energia para a assimilação do NO₃⁻. Quanto a EFUP, observou-se que a quantidade fornecida durante o experimento foi adequada em todos os tratamentos, uma vez que as taxas fotossintéticas não diferiram entre os tratamentos e por considerar que a espécie em estudo é uma leguminosa e que os processos relacionados à nodulação e fixação do N₂ dependem de P (Kleinert *et al.* 2014). Adicionalmente, os teores foliares de P obtidos nessa pesquisa podem ter contribuído para outros processos tais como regulação do ciclo de Calvin e o transporte de metabólicos e de compostos assimilados (Jia e Gray 2004), fato corroborado com os valores das taxas fotossintéticas.

Em relação à EFUK, mesmo os menores teores de K terem sido menores em folhas dos tratamentos I (-N), I +NO₃⁻ e I+NH₄⁺ em relação ao C (-N), não houve diferença entre os tratamentos quanto à eficiência no uso desse nutriente indicando que as menores quantidades de K não interferem no processo fotossintético nas condições que as plantas estavam submetidas. Os resultados obtidos por plantas do tratamento I (-N), os menores teores de Ca podem estar associados à demanda exigida pelas plantas dependentes da FBN, mediante a função deste nutriente na nodulação das leguminosas (Oldory e Downie 2006). Assim como o Ca, o Mg e o Zn neste tratamento estavam em quantidades inferiores em relação aos demais, contudo, não foram prejudiciais tendo em vista que o uso no processo fotossintético não foi afetado.

A maior EFUFe em plantas do tratamento C (-N), não corresponde aos teores obtidos na folhas, sendo que os menores valores foram em plantas do tratamento I +NO₃⁻. Esses resultados sugerem que as plantas do tratamento com NO₃⁻ poderiam ter sua capacidade fotossintética afetada caso houvesse redução dos teores de Fe. A demanda de Fe exigida por plantas do tratamento I +NO₃⁻ pode estar relacionada à maior nodulação e fixação do N₂, onde parte do nutriente absorvido pelas plantas pode estar sendo utilizado em enzimas do processo de FBN (Abdelmanjid *et al.* 2008).

Quantificação dos compostos nitrogenados

Os teores foliares de NO₃⁻ variaram de 0,2 a 0,6 µmol/g, enquanto que nas raízes variaram de 0,03 a 1,9 µmol/g e nos nódulos de 0,3 a 0,52 µmol/g (Tabela 7). Nas três partes das plantas, observou-se o maior acúmulo de NO₃⁻ no tratamento I + NH₄⁺ em relação aos demais tratamentos de fertilização. Em comparação ao tratamento I (-N), plantas do tratamento I + NH₄⁺ exibiram teores de NO₃⁻ em folhas e nódulos cerca de 75 e 50% superiores, respectivamente. Enquanto que nas raízes os valores foram 98% superiores comparado com as plantas do tratamento C (-N). Os teores de NH₄⁺, não diferiram entre os tratamentos nas três partes das plantas analisadas, no entanto, verificou-se maior acúmulo de NH₄⁺ em relação ao NO₃⁻. Nas folhas, os maiores teores de ureídeos foram observados no tratamento C (-N), enquanto que nos nódulos nos tratamentos C (-N) e I (-N). Não houve diferença entre os tratamentos quanto aos teores de ureídeos nas raízes.

Tabela 7: Teores de nitrato, amônio e ureídeos em folhas, raízes, nódulos de plantas jovens noduladas e não noduladas de *Inga macrophylla* recebendo solução nutritiva sem nitrogênio mineral (-N) e contendo 5 mM de amônio (NH₄⁺) ou nitrato (NO₃⁻). Os valores são médias±desvio-padrão. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan ($p \geq 0,05$) ($n=5$).

Tratamento	Nitrato	Amônio	Ureídeos
	μmol/g	μmol/g	mmol/g
<i>Folha</i>			
C (-N)	0,6 ± 0,1 a	16,5 ± 1,5 a	1,1 ± 0,1 a
I (-N)	0,2 ± 0,0 b	16 ± 1,3 a	1,0 ± 0,1 ab
I + NH ₄ ⁺	0,5 ± 0,1 a	14,8 ± 0,6 a	0,9 ± 0,1 b
I + NO ₃ ⁻	0,6 ± 0,1 a	15,5 ± 1,0 a	1,0 ± 0,1 ab
<i>Raiz</i>			
C (-N)	0,03 ± 0,0 c	12,2 ± 1,4 a	0,6 ± 0,1 a
I (-N)	0,5 ± 0,1 b	13,2 ± 1,9 a	0,6 ± 0,1 a
I + NH ₄ ⁺	1,9 ± 0,4 a	12,4 ± 2,0 a	0,6 ± 0,1 a
I + NO ₃ ⁻	0,5 ± 0,1 b	12,4 ± 1,7 a	0,6 ± 0,1 a
<i>Nódulo</i>			
C (-N)	0,3 ± 0,1 b	18,2 ± 0,8 a	0,7 ± 0,0 a
I (-N)	0,3 ± 0,1 b	17,6 ± 0,9 a	0,7 ± 0,0 a
I + NH ₄ ⁺	0,52 ± 0,1 a	17,2 ± 0,04 a	0,66 ± 0,1 ab
I + NO ₃ ⁻	0,46 ± 0,2 ab	17,2 ± 1,0 a	0,5 ± 0,1 b

As diferentes quantidades de compostos nitrogenados nas espécies vegetais são decorrentes da atividade de enzimas na redução e assimilação nos diferentes tecidos das plantas que podem ser influenciadas pelas condições ambientais, a necessidade do uso dos nutrientes, uma vez que o NO₃⁻ e os ureídeos podem ser estocados nas plantas antes de serem reduzidos a outras formas. No caso do NH₄⁺, a toxicidade pode ser um fator que induz a rápida assimilação pelas plantas (Camargos e Sodek 2010; Andrews *et al.* 2013; Werner *et al.* 2013; Tegeder 2014).

Na espécie *I. macrophylla*, foi verificado baixos teores de NO₃⁻ em todos os tratamentos quando comparado aos teores de NH₄⁺ e ureídeos, o pode estar relacionado à rápida redução do NO₃⁻ a NO₂⁻ e posteriormente a NH₄⁺, o que justifica os elevados teores de NH₄⁺ ou ainda por ser resultado da fixação do N₂. Diferente dos resultados obtidos por *I.*

macrophylla, plantas da espécie *Inga edulis* fertilizadas com NO_3^- ou NH_4^+ (5 mM), os teores de NO_3^- foram dez vezes superiores ao encontrado para *I. macrophylla* nos diferentes tecidos das plantas, ao passo que o NH_4^+ foi rapidamente assimilado, não sendo detectado em folhas, raízes e nódulos. Quanto aos teores de ureídeos, os valores encontrados para *I. edulis* foram bastante reduzidos em comparação a *I. macrophylla*, prevalecendo os maiores teores de aminoácidos (Omena-Garcia *et al.* 2015).

A fertilização nitrogenada em ambas as formas não interferiram no processo de FBN. Em *I. macrophylla*, os ureídeos são a principal forma de acúmulo de N em folhas, raízes e nódulos. Para grande parte de espécies de leguminosas, a presença do NO_3^- reduz a nodulação e a fixação do N_2 (Glyan'ko *et al.* 2009). Contudo, para *I. macrophylla* o NO_3^- não afetou a nodulação, diferente dos resultados obtidos em plantas do tratamento I+ NH_4^+ . Em *Lonchocarpus muehlbergianus*, os valores de ureídeos não diferiram estatisticamente entre os tratamentos em nenhuma das partes da planta. Os teores de ureídeos da seiva indicaram que a fixação biológica nos nódulos estava plenamente ativa mesmo nos tratamentos em que plantas noduladas foram submetidas ao tratamento com NO_3^- (Moreira *et al.* 2014).

A verificação de alterações no padrão de compostos nitrogenados translocados via xilema é uma maneira de avaliar a atividade assimilatória do nódulo, pois a translocação de ureídeos via xilema, compostos diretamente associados com a fixação do N_2 , está intimamente relacionada com a taxa de fixação como demonstrado em outros trabalhos (Amarante *et al.* 2006; Camargos e Sodek 2010). Nesta pesquisa, verificou-se que os ureídeos são a principal forma de transporte de nitrogênio pela seiva do xilema em *I. macrophylla* independente da forma de N fornecida (Fig. 6).

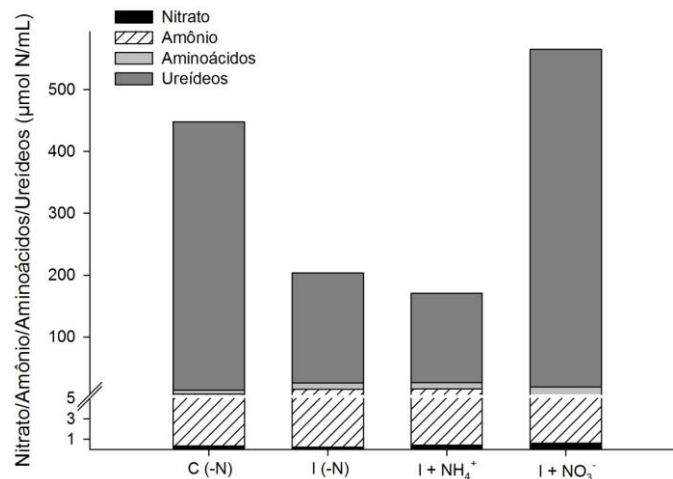


Figura 6: Distribuição do conteúdo de nitrato, ureídeos, amônio e aminoácidos na seiva do xilema de plantas jovens noduladas e não noduladas de *Inga macrophylla* recebendo solução nutritiva sem nitrogênio mineral (-N) e contendo 5 mM de amônio (NH₄⁺) ou nitrato (NO₃⁻).

Em algumas espécies de leguminosas, o NO₃⁻ causa redução nos teores de ureídeos no xilema, reflexo da inibição da fixação de N₂ provocada pelo NO₃⁻, enquanto ocorre aumento de NO₃⁻ nos exsudatos do xilema (Kato *et al.* 2010). Em *I. macrophylla*, os teores de NO₃⁻ transportados para a parte aérea foram baixos em todos os tratamentos. A ausência de redução nos teores de ureídeos translocados via xilema indica que a presença de N mineral no meio externo não influenciou na fixação do N₂ em *I. macrophylla*, uma vez que observou-se altos teores de ureídeos sendo translocados na seiva do xilema em todos os tratamentos avaliados e o maior acúmulo em folhas em relação ao NO₃⁻ e NH₄⁺, indicando que as plantas conseguiram usar o N da fixação biológica bem como o disponível em solução nutritiva, visto que os teores de NO₃⁻ e NH₄⁺ foram reduzidos nos demais tecidos das plantas em relação aos teores de ureídeos (Tabela 7).

Os elevados teores de ureídeos em plantas de *I. macrophylla* fertilizadas com NO₃⁻ pode ser relacionado a nodulação e a maior massa seca dos nódulos como descrito anteriormente. No entanto, em plantas fertilizadas com NH₄⁺ não é observada esta relação, pois mesmo esta fonte de N mineral reduzir a nodulação, a massa seca dos nódulos foi igual a do tratamento C (-N) que teve maior nodulação, os ureídeos não foram afetados. A relação entre o aumento da nodulação e da massa seca dos nódulos com o transporte de ureídeos foi verificado em *Lonchocarpus muehlbergianus* (Moreira *et al.* 2014).

Resultados obtidos pela espécie *Calopogonium mucunoides*, o tratamento com NO_3^- (15 mM) causou redução do número de nódulos, porém não afetou a massa de nódulos das plantas. Nesse experimento, a atividade da enzima nitrogenase manteve-se constante quando a planta foi tratada com solução nutritiva contendo NO_3^- (15 mM), mas reduziu 59% quando cultivada em solução com NO_3^- (30 mM) (Camargos e Sodek 2010).

Na espécie *Inga edulis*, mesmo a nodulação e a massa seca dos nódulos terem sido estimuladas pela fertilização com NH_4^+ (5 mM), os aminoácidos foram a forma predominante na seiva (Omena-Garcia *et al.* 2011). Enquanto que a espécie *I. macrophylla* se enquadra no grupo de leguminosas transportadora de ureídeos, assim como a soja e espécies pertencentes a tribo Phaseoleae (Mcclure e Israel 1979; King e Purcell 2005). O transporte das formas de ureídeos é vantajoso para as plantas, uma vez que para cada carbono da constituição dos ureídeos, um N é transportado, o que não ocorre com os aminoácidos comumente transportados pela seiva do xilema de leguminosas, como glutamina e asparagina e suas aminas glutamato e aspartato (Amarante *et al.* 2006). Adicionalmente, os ureídeos são usados como uma forma de estocar N, e utilizados mediante a demanda de N exigida para diferentes processos nas plantas (Smith e Atkins 2002; Tegeder 2014).

Perfil de aminoácidos da seiva

Dentre os aminoácidos transportados pela seiva do xilema, destaca-se a asparagina (ASN) em todos os tratamentos (Figura 7). Neste caso, o transporte de ASN em uma espécie arbórea pode ser considerado vantajoso, uma vez que, este aminoácido é menos reativo e mais solúvel, sendo desta forma ideal para transportes a longas distâncias (Sieciechowicz *et al.* 1988).

É importante ressaltar que informações a respeito do transporte de aminoácidos livres em espécies arbóreas são limitadas e partes dos trabalhos existentes são com espécies cultivadas. Contudo, no estudo realizado em áreas em processo de regeneração natural na Mata Atlântica com espécies arbóreas, verificou que *Inga marginata* apesar do aminoácido ASN ser a principal forma de transporte de N, esta espécie também conseguiu se beneficiar do processo de FBN mediante a presença de ureídeos na seiva mesmo em menor quantidade (Aidar *et al.* 2003). Enquanto que em espécies de *Acácia* crescendo em áreas impactadas na Austrália, transportam entre 40 e 60% de ASN do total de compostos orgânicos nitrogenados na seiva do xilema (Pfautsch *et al.* 2009). Plantas jovens noduladas de *Inga edulis* o

transporte de ASN (cerca de 60%) foi predominante na seiva do xilema, independente da fonte de N mineral ofertada (Omena-Garcia *et al.* 2011).

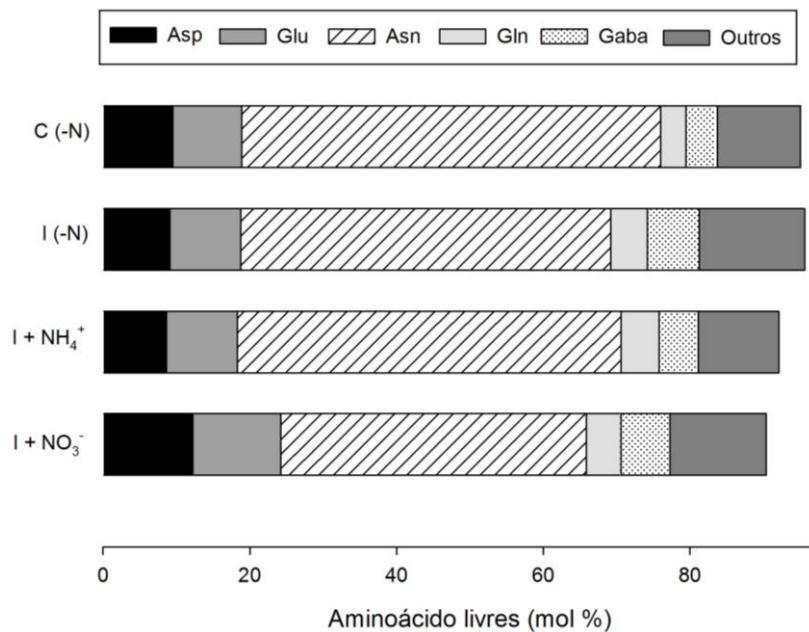


Figura 7: Perfil de aminoácidos na seiva do xilema de plantas jovens noduladas e não noduladas de *Inga macrophylla* recebendo solução nutritiva sem nitrogênio mineral (-N) e contendo 5 mM de amônio (NH₄⁺) ou nitrato (NO₃⁻) (n=5). Aspartato (Asp), glutamato (Glu), asparagina (Asn), Ácido gama-aminobutírico (Gaba).

No contexto nutricional, outra vantagem relacionada ao transporte de ASN em detrimento ao transporte de outros aminoácidos, é a de possuir melhor relação N:C (2:4) quando comparado à GLN (2:5), transportando a mesma quantidade de N por molécula, economizando carbono das reservas do sistema radicular necessárias como substrato para os processos respiratórios envolvidos na obtenção de energia para o crescimento e desenvolvimento do organismo vegetal (Sieciechowicz *et al.* 1988). Adicionalmente, no caso da ASN, qualquer que seja a forma inicial do seu metabolismo em folhas e tecidos verdes, o N do grupo amina acaba sendo liberado na forma de NH₄⁺ e, a partir desse ponto, o metabolismo segue a via ação do complexo enzimático sintetase da glutamina/ 2-oxoglutarato amidatransferase da glutamina (GS/GOGAT) fornecendo o N para a biosíntese de todos os aminoácidos (Heidari *et al.* 2011).

Os aminoácidos aspartato (ASP) e glutamina (GLN) estão presentes de forma similar em todos os tratamentos, porém em menores quantidades em relação a ASN. De certa forma,

era de se esperar baixas concentrações de ASP e GLN, visto que estes dois aminoácidos são precursores metabólicos para a síntese de outros aminoácidos como o GLU e ASN por ação da enzima asparagina sintetase (AS), enquanto que o aminoácido GLN entra na rota metabólica para a síntese de ureídeos que foi predominante em *I. macrophylla* (Suliman *et al.* 2010).

O aminoácido GABA está presente em pequenas quantidades em todos os tratamentos de fertilização. O aminoácido GABA pode ser encontrado em concentrações mais elevadas nos nódulos de leguminosas. O papel fisiológico do GABA em funcionamento nódulo ainda não é claro, mas este metabolito é facilmente acumulado em resposta ao estresse, bem como das condições que eram projetados para regulação da atividade da enzima nitrogenase (Suliman *et al.* 2010).

Em síntese dos resultados apresentados, a FBN da espécie *I. macrophylla* não foi afetada pelas formas de N mineral fato comprovado pela presença pronunciada dos ureídeos em todas as partes das plantas e por ser o composto majoritário na seiva do xilema, diferindo da maior parte das espécies que demonstram sensibilidade mediante a disponibilidade de N mineral no solo. O comportamento de *I. macrophylla* assemelha-se de um pequeno grupo de espécies tropicais que conseguem utilizar diferentes formas de N.

CONCLUSÃO

Plantas de *I. macrophylla* respondem mais efetivamente a combinação inoculação com NH_4^+ quanto aos parâmetros de crescimento, acúmulo de massa seca, decorrente da maior assimilação de carbono nessa condição.

Diferente dos resultados encontrados em grande parte das leguminosas o NO_3^- favoreceu a nodulação e o acúmulo de massa seca dos nódulos enquanto que para o NH_4^+ não houve um efeito significativo.

Independente da forma de nitrogênio fornecida, os ureídeos são a forma predominante de transporte de nitrogênio via xilema, indicando a capacidade da espécie *I. macrophylla* de utilizar tanto o N mineral quanto o proveniente da fixação biológica do nitrogênio.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdelmajid, K.; Karim, B.H.; Chedley, A. 2008. Symbiotic response of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) to iron deficiency. *Acta Physiology Plant*, 30:27-34.
- Aidar, M.P.M.; Schmidt, S.; Moss, G.; Stewart, G.R.; Joly, C.A. 2003. Nitrogen use strategies of neotropical rainforest trees in threatened Atlantic Forest. *Plant, Cell and Environment*, 26: 389-399.
- Amarante, L.; Lima, J.D.; Sodek, L. 2006. Growth and stress conditions cause similar changes in xylem amino acids for different legume species. *Environmental and experimental Botany*, 58: 123-129.
- Andrews, M.; Raven, J.A.; Lea, P.J. 2013. Do plants need nitrate? The mechanisms by which nitrogen. *Annals of Applied Biology*, 163: 174-199.
- Ariz, I.; Artola, E.; Cabrera-Asensio, A.; Cruchaga, S.; Aparicio-Tejo P.M.; Moran, J.F. 2011. High irradiance increases NH_4^+ tolerance in *Pisum sativum*: higher carbon and energy availability improve ion balance but not N assimilation. *Journal of Plant Physiology*, 168: 1009-1015.
- Barreto, D.C. de S.; Gonçalves, J.F.C.; Santos Júnior, U.M.; Fernandes, A.V.; Bariani, A.; Sampaio, P.T.B. 2007. Biomass accumulation, photochemical efficiency of photosystem II, nutrient contents and nitrate reductase activity in young rosewood plants (*Aniba rosaeodora* Ducke) submitted to different $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ ratios. *Acta Amazonica*, 37: 533-542.
- Barron, A.R.; Purves, D.W.; Hedin, L.O. 2011. Facultative nitrogen fixation by canopy legumes in a lowland tropical forest. *Oecologia*, 165: 511-520.
- Batterman, S. A.; Wurzbarger, N.; Hedin, L. O. 2013. Nitrogen and phosphorus interact to control tropical symbiotic N_2 fixation: a test in *Inga punctata*. *Journal of Ecology*, 101: 1400-1408.
- Bialeski, L.R.; Turner, N.A. 1966. Separation and estimation of amino acids in crude plant extracts by thin-layer electrophoresis and chromatography. *Analytical Biochemistry*, 17: 278-293.
- Bloom, A.J.; Asensio, J.S.R.; Randall, L.; Rachmilevitch, S.; Cousins, A.B.; Carlisle, E.A. 2012. CO_2 enrichment inhibits shoot nitrate assimilation in C3 but not C4 plants and slows growth under nitrate in C3 plants. *Ecology*, 93: 355-367.

- Bloom, A.J.; Sukrapanna, S. S.; Warner, R. L. 1992. Root respiration associated with ammonium and nitrate absorption and assimilation by barley. *Plant Physiology*, 99: 1294-1301.
- Bollman, M.I.; Vessey, J.K. 2006. Differential effects of nitrate and ammonium supply on nodule initiation, development, and distribution on roots of Pea (*Pisum sativum*). *Canadian Journal of Botany*, 84: 893-903.
- Boudsocq, S.; Niboyet, A.; Lata, C.; Raynaud, X.; Loewlle, N.; Mathiew, J.; Blowin, M.; Abbadie, L.; Barot, S. 2012. Plant Preference for Ammonium versus Nitrate: A Neglected determinant of Ecosystem Function? *The American Naturalist*, 180: 60-69.
- Britto, D. T.; Kronzucker, H. 2013. Ecological significance and complexity of N-source preference in plants. *Annals of Botany*, 112: 957-963.
- Bugbee, B. G. 1996. Growth, analysis and yield components. In: Salisbury, F. B. Units, Symbols, and Terminology for plant physiology. *Oxford University Press*, 115-119p.
- Camargos, L. S. 2007. Alterações no metabolismo de compostos nitrogenados em *Calopogonium mucunoides* em resposta a diferentes fontes de nitrogênio: efeitos na nodulação e na fixação. Tese de doutorado apresentada a Universidade Estadual de Campinas-UNICAMP. Campinas/SP, 142p.
- Camargos, L.S.; Sodek, L. 2010. Nodule growth and nitrogen fixation of *Calopogonium mucunoides* L. show low sensitivity to nitrate. *Symbiosis*, 51: 167-174.
- Cataldo, D.A.; Harron, M.; Schrader, L.E.; Youngs, V.L. 1975. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 6: 71-80.
- Chen, J.W.; Quing, Z.; Zhou, P.; Hai, M.R.; Tang, T.X.; Liang, Y.L.; An, T.X. 2013. Biomass accumulation and partitioning, photosynthesis, and photosynthetic induction in field-grown maize (*Zea mays* L.) under low and high nitrogen conditions. *Acta Physiology*, 35:95-105.
- Crusciol, C.A.C.; Garcia, R.A.; Castro, G.S.A.; Rosolem, C.A. 2011. Nitrate role in basic cation leaching under no-till. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 35: 1975-1984.
- Dan, T.H.; Brix, H. 2009. Growth responses of the perennial legume *Sesbania sesban* to NH₃ and NO₃⁻ nutrition and effects on root nodulation. *Aquatic Botany*, 91: 238-244.

- Datta, A.; Brian, M. S.; Kristiansen, P.; Robin, S.; Jessop, R.S.; Felton, W.F. 2009. Effect of isoxaflutole on the growth, nodulation and nitrogen fixation of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Crop Protection*, 28: 923-927.
- Davanso, V.M.; Souza, L.A.; Medri, M.E.; Pimenta, J.A.; Bianchini, E. 2002. Photosynthesis, growth and development of *Tabebuia avellaneda* Lor. Ex Griseb. (Bignoniaceae) in flooded soil. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 45: 375-384.
- Divito, G.A.; Sadras, V.O. 2014. How do phosphorus, potassium and sulphur affect plant growth and biological nitrogen fixation in crop and pasture legumes? A meta-analysis. *Field Crops Research*, 156: 161-171.
- Downie, J. A. 2005. Legume haemoglobins: Symbiotic nitrogen fixation needs bloody nodules. *Current Biology*, 15: 196-198.
- Eichelmann, H.; Oja, V.; Rasulov, B.; Padu, E.; Bichele, I.; Pettai, H.; Mänd, P.; Kull, O.; Laisk, A. 2005. Adjustment of leaf photosynthesis to shade in a natural canopy: reallocation of nitrogen. *Plant, Cell and Environment*, Oxford, 28:389-401.
- Evans, J.R.; Poorter, H. 2001. Photosynthetic acclimation of plants to growth irradiance: the relative importance of SLA and nitrogen partitioning in maximizing carbon gain. *Plant Cell & Environment*, 24:755-768.
- Ferreira, O.G.L.; Rossi, F.D.; Andrighetto, C. 2008. DDA: Determinador Digital de Áreas – Software para determinação de área foliar, índice de área foliar e área de olho deombo. Versão 1.2. Santo Augusto: IFFarroupilha.
- Gehring, C.; Vlek, P.L.G.; Souza, L.A.G.; Denich, M. 2005. Biological nitrogen fixation in secondary regrowth and mature rainforest of central Amazonia. *Ecosystems and Environment*, 111:237-252.
- Glyan'ko, A.K.; Vasil'eva G.G.; Mitanova, N.B.; Ishchenko, A.A. 2009. The influence of mineral nitrogen on legume-rhizobium symbiosis. *Biology Bulletin*, 36:250-258.
- Gonçalves, C.A.; Goi, S.R.; Jacob-Neto, J. 1999. Crescimento e nodulação de *Inga marginata* em resposta à adição de nitrogênio, fósforo e inoculação com rizóbio. *Floresta e Ambiente*, 6:118-126.
- Graham, P. H.; Vance, C. P. 2000. Nitrogen fixation in perspective, an overview of research and extension needs. *Field Crops Res.*, 65: 93-106.
- Guo, S.; Zhou, Y.; Shen, Q.; Zhang, F. 2007. Effect of Ammonium and Nitrate on some Physiological Process in Higher Plants-Growth, Photosynthesis, Photorespiration, and water relations. *Plant Biology*, 9:21-29.

- Hageman, R.H. 1984. Ammonium versus nitrate nutrition of higher plants. In: Hauck, R. *Nitrogen in crop production. Madison: American Society of Agronomy*, 67-86p.
- Hawkins BJ, Robbins S. 2010. pH affects ammonium, nitrate and proton fluxes in the apical region of conifer and soybean roots. *Physiologia Plantarum*, 138: 238-247.
- Hedin, L.O.; Brookshire, E. N. J.; Menge, D. N. L.; Barron, A. R. 2009. The nitrogen paradox in tropical forest ecosystems. *Annu Rev Ecol Evol Syst*, 40:613-635.
- Heidari, B.; Matre, P.; Nemie-Feyissa, D.; Meyer, C.; Rognli, Q.A.; Møller, S.G.; Lillo, C. 2011. Protein phosphatase 2A B55 and A regulatory subunits interact with nitrate reductase and are essential for nitrate reductase activation. *Plant Physiology*, 156:165-172.
- Helali, S.M.; Nebli, H.; Kaddour, R.; Mahmoudi, H.; Lachaâl, M.; Oureghi, Z. 2010. Influence of nitrate-ammonium ratio on growth and nutrition of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Soil*, 74: 336-365.
- Hendry, G.A.F.; Price, A.H. 1993. Stress indicators: Chlorophylls and carotenoids. In: Hendry, G.A.F.; Grime, J.P. (ed.), *Methods in Comparative Plant Ecology*. Chapman and Hall, London. p. 148-152.
- Hidaka, A.; Kitayama, K. 2009. Divergent patterns of photosynthetic phosphorus-use efficiency versus nitrogen-use efficiency of tree leaves along nutrient-availability gradients. *Journal of Ecology*, 97: 984-991.
- Hirel, B.; T'etu, T.; Lea, P.J.; Dubois, F. 2011. Improving nitrogen use efficiency in crops for sustainable agriculture. *Sustainability*, 3:1452-1485.
- Hoagland, D.R.; Arnon, D.I. 1950. *The water culture method for growing plants without soil*. University of California Agricultural Experimental Station, Berkeley, USA. 347p.
- Holzschuch, M.J.; Bohnen, H.; Anghinoni, I.; Pizzalato, T.M.; Carmona, F.C.; Carlos, F.S. 2011. Absorção de nutrientes e crescimento do arroz com suprimento combinado de amônio e nitrato. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 35: 1537-1366.
- Imssande, J. 1988. Enhanced nitrogen fixation increases net photosynthetic output and seed yield of hydroponically grown soybean. *Journal of Experimental Botany*, 39: 1313-1321.
- Iqbal, R.M.; Rao, A.R.; Rasul, E.; Wahid, A. 1997. Mathematical models and response functions in photosynthesis: an exponential model. In: Pessarakli, M. (Ed.). *Handbook of photosynthesis*. Marcel Dekker Inc., New York, p. 803-810.

- Jaquetti, R.K.; Gonçalves, J.F.C.; Ferraz, J.B.S.; Ferreira, M.J.; Santos Júnior, U.M.; Lacerda, C.F. 2014. Green Fertilization enhances the Photosynthetic Performance and the growth of Leguminous Trees for Restoration Plantation in Central Amazon. *American Journal of Plant Sciences*, 5: 2497-2508.
- Jarret, H. W.; Cooksey, K. D.; Ellis, B.; Andersen, J. M. 1986. The separation of o-Pthaldehyde derivatives of amino acids by reverse-phase chromatography on octylsilica columns. *Analytical Biochemical*, 153: 189-198.
- Jia, Y.; Gray, V.M. 2004. Influence of phosphorus and nitrogen on photosynthetic parameters and growth in *Vicia faba L.* *Photosynthetica*, 42: 535-542.
- Kaschuk, G.; Kuyper, T.W.; Leffelaar, P.A.; Hungria, M.; Giller, K.E. 2009. Are the rates of photosynthesis stimulated by the carbon sink strength of rhizobial and arbuscular mycorrhizal symbioses? *Soil Biology and Biochemistry*, 41: 1233-1244.
- Kato, K.; Kanahama, K.; Kanayama, Y. 2010. Involvement of nitric oxide in the inhibition of nitrogenase activity by nitrate in Lotus root nodules. *Journal of Plant Physiology*, 167: 238-241.
- King, C.A.; Purcell, L.C., 2005. Inhibition of N₂ fixation in soybean is associated with elevated ureides and amino acids. *Plant Physiology*, 137:1389-1396.
- Kirkby, E.A.; Johnston, A.E.J. 2008. Soil and fertilizer phosphorus in relation to crop nutrition. In: White PJ, Hammond JP, editors. The ecophysiology of plant-phosphorus interactions. Dordrecht, the Netherlands: *Springer*, 177-223.
- Kleinert, A.; Venter, M.; Kossmann, J.; Valentine, A. 2014. The reallocation of carbon in P deficient *lupins* affects biological nitrogen fixation. *Journal of Plant Physiology*, 171:1619-1624.
- Klotz, M.G.; Stein, L.Y. 2008. Nitrifier genomics and evolution of the nitrogen cycle. *FEMS Microbiology Letters*, 278: 146-56.
- Konnerup, D.; Brix, D. 2010. Nitrogen nutrition of *Canna indica*: Effects of ammonium versus nitrate on growth, biomass allocation, photosynthesis, nitrate reductase activity and N uptake rates. *Aquatic Botany*, 92: 142-148.
- Laliberte, E.B.; Shipley, D.A.; Norton, D.; Scott. 2012. Which plant traits determine abundance under long-term shifts in soil resource availability and grazing intensity? *Journal of Ecology*, 100: 662-677.

- Lawlor, D.W. 2002. Carbon and nitrogen assimilation in relation to yield: mechanisms are the key to understanding production systems. *Journal of Experimental Botany*, 53: 773-787.
- Lawrence, A.; Pennington, T. D.; Hands, M. R.; Zúniga, R. A. 1995. Inga: High diversity in the neotropics nitrogen fixing trees for acid soils. *Nitrogen fixing tree Research Reports Special*, 3: 130-141.
- Lea, P. J.; Sodek, L.; Parry, M. A. J.; Shewry, P. R.; Halford, N. G. 2007. Asparagine in plants. *Annals of Applied Biology*. 150: 1-26.
- Li, H.; Li, M.; Luo, J.; Cao, X.; Qu, L.; Gai, Y.; Jiang, X.; Bai, H.; Janz, D.; Polle, A.; Peng, C.; Luo, Z.B. 2012. N-fertilization has different effects on the growth, carbon and nitrogen physiology, and wood properties of slow- and fast-growing *Populus* species. *Journal of Experimental Botany*, 1: 2-13.
- Lichtenthaler, H.K.; Wellburn, A.R. 1983. Determination of total carotenoids and Chlorophyll *a* and *b* of leaf extracts in different solvents. *Biochemical Society Transactions*, 11: 591-592.
- Lojka, B.; Preininger, D.; Van Damme, P.; Rollo, A.; Banout, J. 2012. Use of the Amazonian tree species *Inga edulis* for soil regeneration and weed control. *Journal of Tropical Forest Science*, 24: 89-101.
- Luizão, R.C.C.; Bonde, T.A.; Rosswall, T. 1992. Seasonal variation of soil microbial biomass – The effects of clearfelling a tropical rainforest and establishment of pasture in the central Amazon. *Soil Biology and Biochemistry*, 24: 805-813.
- Makarova, L.E.; Latysheva, S.E.; Putilina, T.E. 2007. The Effect of the Phenolic Compounds Exuded by Pea Roots in Darkness on the Reproduction of *Rhizobium*, *Prikl. Biokhim. Mikrobiol*, 43: 479-485.
- Malavolta, E.; Vitti, G. C.; Oliveira, S. A. 1997. *Avaliação do estado nutricional de plantas: princípios e aplicações*. Piracicaba, Potafos, 308p.
- Marengo, R.A.; Lopes, R.F. 2009. *Fisiologia Vegetal: fotossíntese, respiração, relações hídricas e nutrição mineral*. 3ª ed. Editora UFV, Minas Gerais, 486 pp.
- Marschner, P. 2012. *Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants*. 3ª edição, Elsevier, 643 p.
- Martínez-Andújar, C.; Ghanem, M.E.; Albacete, A.; Pérez-Alfocea, F. 2013. Response to nitrate/ammonium nutrition of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plants

- overexpressing a prokaryotic NH_4^+ dependent asparagine synthetase. *Journal of Plant Physiology*, 170: 676-687.
- McClure P.R.; Israel D.W. 1979. Transport of nitrogen in the xylem of soybean plants. *Plant Physiology*, 64: 411-416.
- McCullough, H. 1967. The determination of ammonium in whole blood by a direct colorimetric method. *Clinica Chimica Acta*, 17: 297-304.
- Messier, J.; B. J. McGill; M. J. Lechowicz. 2010. How do traits vary across ecological scales? A case for trait-based ecology. *Ecology Letters*, 13: 838-848.
- Metay, A.; Oliver, R.; Scopel, E.; Douzet, J.; Moreira, J.A.A.; Maraux, F.; Feigl, B.J.; Feller, C. 2007. N_2O and CH_4 emissions from soils under conventional and no-till management practices in Goiânia (Cerrados, Brazil). *Geoderma*, 141: 78-88.
- Miyazawa, M.; Pavan, M. A.; Muraoka, T.; Carmo, C. A. F. S.; Melo, W. J. 1999. Análise química de tecidos vegetais. In: Silva, F. C. (Ed.). Manual de Análise Química de Solos, Plantas e Fertilizantes. EMBRAPA, Brasília, p. 172-223.
- Moreira, F.M.S. 2008. Bactérias fixadoras de nitrogênio que nodulam Leguminosae. In: Moreira, F.M.S.; Siqueira, J.O.; Brussaard, L. (Eds.) Biodiversidade do Solo em Ecossistemas brasileiros. Editora UFLA, Lavras, MG, p. 621-680.
- Moreira, V.; Justino, G.C.; Camargos, L.S.; Aguiar, L.F. 2014. Características adaptativas da associação simbiótica e da fixação biológica do nitrogênio molecular em plantas jovens de *Lonchocarpus muehlbergianus* Hassl., uma leguminosa arbórea nativa do Cerrado. *Rodriguésia*, 65: 517-525.
- Nacry, P.; Bouguyon, E.; Gojon, A. 2013. Nitrogen acquisition by roots: physiological and developmental mechanisms ensuring plant adaptation to fluctuation resource. *Plant and Soil* 370: 1-29.
- Naudin, C.; Corre-Helloua, G.; Sylvain, P.; Yves, C.; Marie-Hélène, J. 2010 The effect of various dynamics of N availability on winter pea–wheat intercrops: Crop growth, N partitioning and symbiotic N_2 fixation. *Field Crops Research*, 119: 2-11.
- Nichols, J.D.; Carpenter, F.L. 2006. Interplanting *Inga edulis* yields nitrogen benefits to *Terminalia Amazonia*. *Forest Ecology and Management*, 233: 344-351.
- Nikiforou, C.; Manetas, Y. 2011. Inherent nitrogen deficiency in *Pistacia lentiscus* preferentially affects photosystem I: a seasonal field study. *Functional Plant Biology*, 38: 848-855.

- Oldroyd, G.E.D.; Downie, J.A. 2006. Nuclear calcium changes at the core of symbiosis signalling. *Curr. Opin. Plant Biology*, 9:351-357.
- Omena-Garcia, R.P.; Justino, G.C.; Araújo, V.B.F.; Souza, L.A.G.; Camargos, L.S.; Gonçalves, J.F.C. 2015. Mineral of nitrogen associated changes in growth and xylem-N compounds in Amazonia legume tree. *Journal of Plant Nutrition*, 4: 584-595.
- Omena-Garcia, R.P.; Justino, G.C.; Soodek, L.; Gonçalves, J.F.C. 2011. Mineral nitrogen affects nodulation and amino acid xylem transport in the Amazonian legume *Inga edulis* Mart. *International Journal of Plant Physiology and Biochemistry*, 3: 3-6.
- Ortiz-Ramirez C., Mora S.I., Trejo J., Pantoja O. 2011. PvAMT1;1, a highly selective ammonium transporter that functions as H⁺/NH₄⁺ symporter. *Journal of Biological Chemistry*, 286: 31113-31122.
- Otuba, M.; Weih, M. 2015. Effects of Soil Substrate and Nitrogen Fertilizer on Growth Rate of *Acacia senegal* and *Acacia sieberiana* in North Eastern Uganda. *International Journal of Agriculture and Forestry*, 5: 10-16.
- Owen, A.G.; Jones, D.L. 2001. Competition for amino acids between wheat roots and rhizosphere microorganisms and the role of amino acids in plant N acquisition. *Soil Biology and Biochemistry*, 33: 651-657.
- Pagnussat, G.G.; Simontacchi, M.; Lamattina, L. 2002. Nitric Oxide Is Required for Root Organogenesis. *Plant Physiology*, 129: 954-956.
- Papageorgiou, G.C.; Govindjee (Eds.) 2004. 'Chlorophyll *a* fluorescence: asignature of photosynthesis.' (Springer: Dordrecht).
- Pasquini, S. C.; Santiago, L. S. 2012. Nutrients limit photosynthesis in seedlings of a lowland tropical Forest tree species. *Oecologia*, 168: 311-319.
- Paungfoo-Lonhienne, C.; Lonhienne, T. G. A.; Rentsch, D.; Robinson, N.; Christie, M., Webb, R. I.; Gamage, H. K.; Carroll, B. J.; Schenk, P. M.; Schmidt, S. 2008. Plants can use protein as a nitrogen source without assistance from other organisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105: 4524-4529.
- Pereira, E.G.; Siqueira, J.O.; Vale, F.R.; Moreira, F.M.S. 1996. Influência do nitrogênio mineral no crescimento e colonização micorrízica de mudas de árvores. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 31: 653-662.
- Pfautsch, S.; Gessler, A.; Adams, M. A.; Renner, H. 2009. Using amino-nitrogen pools and fluxes to identify contributions of understory *Acacia* spp. to overstory *Eucalyptus*

- regnans* and stand nitrogen uptake in temperate Australia. *New Phytologist*, 183: 1097-1113.
- Raghothama, K.G. . 1999. Phosphate acquisition. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 50: 665-693.
- Raven, J. A. 1985. Regulation of pH and generation of osmolarity in vascular plants: A cost-benefit analysis in relation to efficiency of use of energy, nitrogen and water. *New Phytology*, 101: 25-77.
- Reis, V. M. 2013. Como fazer uma agricultura verde usando o mais antigo processo de obtenção de nitrogênio em plantas. *Acta Sciential & Technical*, 1: 15-23.
- Rogato, A.; D'Apuzzo, E.; Barbulova, A.; Omrane, S.; Parlati, A.; Carfanga, S.; Costa, A.; Schiavo, F.L.; Esposito, S.; Chiurazzi, M. 2010. Characterization of a developmental root response caused by external ammonium supply in *Lotus japonicus*. *Plant Physiology*, 154: 784-795.
- Rogers, A.; Ainsworth, E.A.; Leakey, A.D.B. 2009. Will elevated carbon dioxide concentration amplify the benefits of nitrogen fixation in legumes? *Plant Physiology*, 151: 1009-1016.
- Salomon, E.; Bar-Eyal, L.; Sharon, S.; Keren, N. 2013. Balancing photosynthetic electron flow is critical for cyanobacterial acclimation to nitrogen limitation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 3: 340-347.
- Samuel, S.; Scott, P.T.; Gresshoff, P.M. 2013. Nodulation in the legume biofuel feedstock tree *Pongamia pinnata*. *Agricultural Research*, 2:207-214.
- Santiago, W.R.; Vasconcelos, S.S.; Kato, O.R.; Bispo, C. J.C.; Rangel-Vasconcelos, G.T.; Castellani, D. C. 2013. Nitrogênio mineral e microbiano do solo em sistemas agroflorestais com palma de óleo na Amazônia oriental. *Revista Acta Amazonica*, 43: 395-406.
- Santos Junior, U. M.; Gonçalves, J. F. C; Fearnside, P. M. 2013. Measuring the impact of flooding on Amazonian trees: photosynthetic response models for ten species flooded by hydroelectric dams. *Trees*, 27: 193-210
- Santos Júnior, U.M.; Gonçalves, J.F.C.; Feldpausch, T.R. 2006. Growth, leaf nutrient concentration and photosynthetic nutrient use efficiency in tropical tree species planted in degraded areas in Central Amazonia. *Forest Ecology and Management*, 226: 299-309.

- Schmidt, S.; Stewart, G.R. 1998. Transport, storage and mobilization of nitrogen by trees and shrubs in the wet/dry tropics of northern Australia. *Tree Physiology*, 18: 403-410.
- Sieciechowicz, K. A.; Joy, K.W.; Ireland, R.J. 1988. The metabolism of asparagine in plants. *Phytochemistry*, 27: 663-671.
- Silva, A.H.; Pereira, J.S.; RodrigueS, S.C. 2011. Desenvolvimento inicial de espécies exóticas e nativas enecessidade de calagem em área degradada do Cerrado no triângulo mineiro (Minas Gerais, Brasil). *Agronomía Colombiana*, 29: 287-292.
- Smith, P.M.C.; Atkins, C.A. 2002. Purine biosynthesis. Big in cell division, even bigger in nitrogen assimilation. *Plant Physiology*, 128: 792-802.
- Sodek, L. 2004. *Metabolismo do Nitrogênio*. In: KERBAUY, G.B. Fisiologia Vegetal, Guanabara Koogan, p. 94-113.
- Souza, C.S.C.R.; Silva, C.E.M.; Justino, G.C.; Vera, S.A.A.; Gonçalves, J.F.C. 2012. Características fotossintéticas de plantas jovens de *Inga edulis* submetidas a diferentes fontes de nitrogênio. *Revista Ambiente: Gestão e Desenvolvimento*, 4: 14-27.
- Souza, L.A.G. 2012. Guia da biodiversidade de Fabaceae do Alto Rio Negro. Elaboração Projeto Fronteiras: Alto Rio Negro – Manaus. 116p.
- Sprent, J.I. 2009. Legume nodulation. Wiley-Blackwell, United Kingdom, 200 pp.
- Srivastava, A.; Strasser, R.J.; Govindjee. 1999. Greening of peas: parallel measurements of 77 K emission spectra, OJIP chlorophyll *a* fluorescence transient, period four oscillation of the initial fluorescence level, delayed light emission, and P700. *Photosynthetica*, 37: 365-392.
- Stewart, G.R. 1991. The comparative ecology of plant nitrogen metabolism. In *Plant Growth Interactions with Nutrition and Environment*. (eds J.R. Porter e D.W. Lawlor), Cambridge University Press, Cambridge, UK. 91-97 pp.
- Stewart, G.R.; Hegarty, E.E.; Specht, R.L. 1988. Inorganic nitrogen assimilation in plants of Australian rainforest communities. *Physiologia Plantarum*. 74: 26-33.
- Strasser, R.J.; Tsimilli-Michael, M.; Qiang, S.; Goltsev, V. 2010. Simultaneous *in vivo* recording of prompt and delayed fluorescence and 820-nm reflection changes during drying and after rehydration of the resurrection plant *Haberlea rhodopensis*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1: 313-1326.
- Streeter J. G. 1988. Inhibition of legume nodule formation and N₂ fixation by nitrate. *Critical Review in Plant Science*, 7: 1-23.

- Sulieman, S.; Fischinger, S.A.; Gresshoff, P.M.; Schulze, J. 2010. Asparagine as a major factor in the N-feedback regulation of N₂ fixation in *Mendicago truncatula*. *Physiology Plantarum*, 140: 21-31.
- Tegeder, M. 2014. Transporters involved in source to sink partitioning of amino acids and ureides: opportunities for crop improvement. *Journal of Experimental Botany*, 65: 1865-1878.
- Uscola, M.; Oliet, J.A.; Salvador, P.V.; Pinés, E.D.; Jacobs, D.F. 2014. Nitrogen form and concentration interact to affect the Mediterranean forest trees. *European Journal of Forest Research*, 133: 35-246.
- Vincent, J. 1970. A manual for the practical study of root-nodule bacteria. Oxford: Blackwell.
- Vitousek, P. M.; Menge, D.N.L.; Sasha C. Reed, S.C.; Cleveland, C.C. 2013. Biological nitrogen fixation: rates, patterns and ecological controls in terrestrial ecosystems. *Philosophical Transactions of the Royal Society*, v: 1-9.
- Vitti, G. C.; Ferreira, A. C. 1997. Síntese de análises químicas em tecido vegetal. ESALQ - Departamento de Ciência do Solo.
- Vitti, G. C.; Lima, E.; Cicarone, F. 2006. XII - Cálcio, magnésio e enxofre. In: Fernandes, M. S. (Ed.). *Nutrição Mineral de Plantas*. SBCS, p. 328-352.
- Vogels G.D.; Van Der Drift C. 1970. Differential analyses of glyoxylate derivatives. *Analytical Biochemistry*, 33: 143-157.
- Von Wiren, N.; Merrick, M. 2004. Regulation and function of ammonium carriers in bacteria, fungi and plants. *Topics in Current Genetics*, 9: 95-120.
- Ward, M.H.; Rusiecki, J.A.; Lynch, C.F.; Cantor, K.P. 2007. Nitrate in public water supplies and the risk of renal cell carcinoma. *Cancer Causes Control*, 18: 1141-1151.
- Warren, C. R. 2009. Does nitrogen concentration affect relative uptake rates of nitrate, ammonium, and glycine?. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 172: 224-229.
- Weih, M.; Asplund, L.; Bergkvist, G. 2011. Assessment of nutrient use in annual and perennial crops: A functional concept for analyzing nitrogen use efficiency. *Plant and Soil*, 339: 513-520.
- Werner, A.K.; Medina-Escobar, N.; Zulawski, M.; Sparkes, I.A.; Cao, F.Q.; Witte.C.P. 2013. The ureide-degrading reactions of purine ring catabolism employ three amidohydrolases and one aminohydrolase in arabidopsis, soybean, and rice. *Plant Physiology*, 163: 672-681.

- Wick B.; Veldkamp, E.; Mello W. Z.; Keller M.; Crill P. 2005. Nitrous oxide fluxes and nitrogen cycling along a pasture chronosequence in Central Amazonia, Brazil. *Biogeosciences*, 2: 175-187.
- Zhao, D-Y.; Tian, Q-Y.; Li, L-H.; Zhang, W-H. 2007. Nitric Oxide Is Involved in Nitrate Induced Inhibition of Root Elongation in *Zea mays*. *Annals. Botany*, 100: 497-503.
- Zivcak, M.; Olsovsaka, K.; Slamka, P.; Galambosova, J.; Rataj, V.; Shão, H.B.; Brestic, M. 2014. Application of chlorophyll fluorescence performance indices to assess the wheat photosynthetic functions influenced by nitrogen deficiency. *Plant Soil Environment*, 5: 210-215.