

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

JAVIER ALBERTO PINZÓN TORRES



**ASPECTOS DA FOTOSSÍNTESE E DA ASSIMILAÇÃO
DO NITROGÊNIO EM QUATRO ESPÉCIES DE
LEGUMINOSAS ARBÓREAS TROPICAIS**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Javier Alberto Pinzon
Torres
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de Biologia para
a obtenção do Título de Mestre em Biologia
Vegetal.

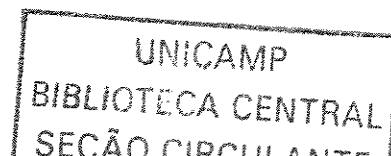
M. Schiavinato

Orientadora: Profa. Dra. Marlene Aparecida Schiavinato

2003

i

UNICAMP



UNIDADE	BE
Nº CHAMADA	
TITULO	UNICAMP
PROB	P658a
V	EX
TOMBO BC	53484
PROC.	124/03
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	30/04/03
Nº CPD	

BIBID. 290738

CM00182585-0

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP**

P658a Pinzón-Torres, Javier Alberto

Aspectos da Fotossíntese e da Assimilação do Nitrogênio em quatro espécies de Leguminosas Arbóreas Tropicais / Javier Alberto Pinzón-Torres. - Campinas, SP : 103p, 2003.

Orientadora: Profa. Dra. Marlene Aparecida Schiavinato.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia.

1. Crescimento -- Plantas. 2. Fotossíntese. 3. Ecofisiologia. I. Schiavinato, Marlene Aparecida. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Data da defesa: 14/02/2003

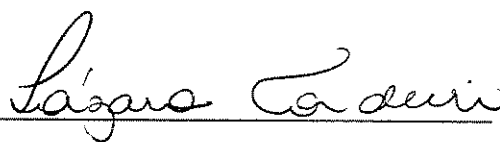
Banca Examinadora:

Prof^a. Dra. Marlene Aparecida Schiavinato



Assinatura

Prof^a. Dra. Lázara Cordeiro

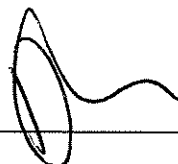


Assinatura

Dra. Rogéria de Souza

Assinatura

Prof. Dr. Paulo Mazzafera



Assinatura

20345408

À SOFI e a nosso filho IORI
ANDRÉ, a melhor lembrança de
nossa estadia no Brasil. Dedico

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela oportunidade na concessão da bolsa de estudo.

À Profa. Dra. Marlene Aparecida Schiavinato, pela orientação, confiança, apoio e amizade.

Aos Professores Dra. Lázara Cordeiro, Dr. Paulo Mazzafera e Dra. Rogéria de Souza, pelas valiosas sugestões na pré-banca.

Aos Professores do Departamento de Fisiologia Vegetal da UNICAMP, especialmente ao Prof. Dr. Ladaslav Sodek, pela assessoria, ensinamentos e valiosa colaboração.

Aos Funcionários do Departamento de Fisiologia Vegetal da UNICAMP, pela valiosa colaboração.

Aos meus amigos, colegas, e todas aquelas pessoas que conheci e estiveram presentes, muito obrigado pela força.

À Sofi, minha companheira e ao Iori, nosso filho, dedico muito especialmente.

À minha família, que sempre apoiou-me lá... na Colômbia.

E ao povo do Brasil... à sua cultura, suas danças, sua amizade, e tudo o que aprendi compartilhando com vocês.... MEU MUITO OBRIGADO!!!

ÍNDICE

Abreviaturas	ix
Resumo	xi
Summary	xiii
I. INTRODUÇÃO GERAL	1
II. OBJETIVOS GERAIS	7
III. CAPÍTULO 1: CRESCIMENTO INICIAL DE QUATRO ESPÉCIES DE LEGUMINOSAS ARBÓREAS TROPICAIS	
1. Introdução	9
2. Material e métodos	13
2.1. Material vegetal	13
2.2. Germinação das sementes e condições de cultivo	13
2.3. Coleta de nódulos, isolamento de rizóbios e produção de inoculantes.	14
2.4. Avaliação do crescimento das plantas	15
2.5. Análise de nitrogênio total	17
2.6. Análise estatística	18
3. Resultados e discussão	19
3.1. Germinação das sementes	19
3.2. Avaliação do crescimento das plantas	20
IV. CAPÍTULO 2: ASPECTOS DA FOTOSSÍNTESE EM QUATRO ESPÉCIES DE LEGUMINOSAS ARBÓREAS TROPICAIS	
1. Introdução	33
2. Material e métodos	38

2.1. Material vegetal e condições de cultivo	38
2.2. Atividade fotossintética e variáveis relacionadas com a fotossíntese ..	38
2.2.1. Conteúdo de clorofila	40
2.3. Análise estatística	41
3. Resultados e discussão	43
3.1. Atividade fotossintética e variáveis relacionadas com a fotossíntese ...	43
V. CAPÍTULO 3: ATIVIDADE ENZIMÁTICA E METABÓLITOS	
RELACIONADOS À ASSIMILAÇÃO DO NITROGÊNIO EM QUATRO	
ESPÉCIES DE LEGUMINOSAS ARBÓREAS TROPICAIS	
1. Introdução	55
2. Material e métodos	61
2.1. Material vegetal e condições de cultivo	61
2.2. Enzimas relacionadas com a assimilação do nitrogênio	61
2.2.1. Atividade da nitrogenase (ARA)	61
2.2.2. Atividade da redutase de nitrato (RN)	63
2.2.3. Atividade da glutamina sintetase (GS)	64
2.2.4. Atividade da glutamato sintase (GOGAT-NADH)	66
2.3. Metabólitos relacionados com a assimilação do nitrogênio	67
2.3.1. Análise de aminoácidos livres totais (ALT)	68
2.3.2. Análise de N-Nitrato (N-NO_3^-)	69
2.3.3. Análise de N-Amônio (N-NH_4^+)	69
2.3.4. Análise de N-Ureídeos totais (URE)	70
2.4. Análise do solo	70
2.5. Análise estatística	71

3. Resultados e discussão	72
3.1. Enzimas e metabólitos relacionadas com a assimilação do nitrogênio .	72
VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85
VII. APÊNDICE	103

ABREVIATURAS

<i>A</i>	Taxa líquida de trocas de CO ₂ (μmol/m ² .s)
<i>A</i> máx.	Taxa líquida de trocas de CO ₂ (μmol/m ² .s) máxima
AF	Área foliar (cm ²)
AFE	Área foliar específica (dm ² /g)
ALT	Aminoácidos livres totais
ARA	Atividade de redução do acetileno (μmol etileno/g nódulos.h)
C	Carbono
<i>C_i</i>	CO ₂ subestomático (μmol/mol)
Clor.	Clorofila
DTT	DL-ditioneítról
<i>E</i>	Taxa de transpiração (mmol/m ² .s)
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EUA	Eficiência do uso da água (μmol CO ₂ /mmol H ₂ O)
FBN - NFB	Nitrogênio fixado biologicamente - Fixação biológica de nitrogênio
GHA	Ácido L-glutâmico-γ-monohidroxiâmato
GOGAT-NADH	Glutamato sintase dependente de β-Nicotinâmida adenina dinucleotídeo, forma reduzida
GLU	L-glutamato
GS	Glutamina Sintetase
<i>g_s</i>	Condutância estomática (mol/m ² .s)
IEUN	Índice de eficiência de utilização do nitrogênio (g ² /g N planta)
Imidazol	1.3-diaza-2,4-ciclopentadieno

MCW	Metano:clorofórmio:água
MF	Massa fresca
MS	Massa seca
N acum.	Nitrogênio acumulado (g N/MS planta)
N total	Nitrogênio total (g N/MS planta)
N ₂ ase	Nitrogenase
PAR	Radiação fotossinteticamente ativa incidente na superfície foliar ($\mu\text{mol f\acute{o}tons/m}^2.\text{s}$)
Prot.	Proteína
PVP	Polivinilpirrolidona
PVPP	Polivinilpolipirrolidona
RAF	Razão de área foliar (dm^2/g)
REN	Relação de eficiência entre MS e N total (g/mg N)
RMC	Razão de massa do caule (g/g)
RMF	Razão de massa foliar (g/g)
RMNod	Razão de massa nodular (g/g)
RMR	Razão de massa radicular (g/g)
Rubisco	Ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase
TAL	Taxa de assimilação líquida ($\text{mg/cm}^2.\text{dia}$)
TCR	Taxa de crescimento relativo (mg/g.dia)
T sup. folha	Temperatura superficial da folha ($^{\circ}\text{C}$)
Tris	2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol
Triton X-100	t-octilfenoxipolietoxietanol
URE	Ureídeos totais

RESUMO

Na composição e estrutura das florestas tropicais, as leguminosas estão entre os grupos melhor representados por apresentarem uma alta diversidade de gêneros e espécies em suas três sub-famílias, Caesalpinioideae, Mimosoideae e Papilionoideae ou Faboideae. Muitas das espécies de leguminosas possuem a capacidade de associar-se a microorganismos fixadores de nitrogênio, formando nódulos radiculares e contribuindo para o ciclo do nitrogênio, desempenhando grande importância ecofisiológica.

O presente trabalho foi dividido em três capítulos, visando estudar alguns aspectos do crescimento, fotossíntese e assimilação do nitrogênio em quatro espécies de leguminosas arbóreas nativas: *Centrolobium tomentosum* Mart. Ex Benth, *Inga vera* Willd., *Lonchocarpus muehlbergianus* Hass. (espécies que formam nódulos radiculares) e *Myroxylon peruiferum* L.f. (espécie que não apresenta nódulos radiculares).

No capítulo I, avaliou-se o crescimento das quatro espécies aos 7 e 10 meses de idade. Observou-se em geral que, *I. vera* apresentou a maior massa seca da parte aérea e o maior acúmulo de nitrogênio nas folhas e que *L. muehlbergianus* apresentou a maior massa seca de raízes e nódulos e o maior acúmulo de nitrogênio em caule, raízes e nódulos. Por sua vez, *M. peruiferum* apresentou a maior taxa de crescimento relativo e a maior razão de acúmulo de nitrogênio final/inicial em folhas, caule e raízes. Quanto à taxa de assimilação líquida, não foram encontradas diferenças significativas para as quatro espécies. Estes resultados permitem sugerir que *M. peruiferum* mesmo não apresentando nódulos radiculares possuiu maior capacidade para incrementar sua biomassa mais rapidamente que as outras espécies, num mesmo intervalo de tempo.

No capítulo II, foram avaliados alguns aspectos da taxa fotossintética e algumas variáveis relacionadas à fotossíntese em plantas com 6 e 7 meses de idade. Supõe-se que, em geral, todas as espécies tenham saturado sua capacidade fotossintética nas primeiras horas da manhã, antes do início das medições sob intensidades luminosas relativamente altas. Mesmo assim, as taxas líquidas de trocas de CO₂ foram relativamente baixas quando comparadas às de outras espécies arbóreas. Observou-se que *I. vera* apresentou a maior condutância estomática, a maior taxa de trocas de CO₂ e a maior taxa de transpiração nas duas idades, que as outras três espécies. As razões de eficiência do uso da água nas espécies estudadas foram maiores que em outras espécies e, entre elas, *C. tomentosum* foi a que apresentou a maior eficiência.

No capítulo III, avaliou-se a atividade de algumas enzimas relacionadas com a assimilação do nitrogênio e alguns metabólitos, produtos dessa assimilação em plantas com 10 meses de idade. De modo geral, observou-se que *I. vera* apresentou a maior atividade de nitrogenase, glutamina sintetase e glutamato sintase dependente de NADH, mas não é produtora de ureídeos, enquanto que *L. muehlbergianus* parece ser produtora de ureídeos. Observou-se grande acúmulo de nitrato nas folhas de *I. vera* e *M. peruiferum*, mas a atividade da redutase de nitrato nestas espécies foi maior na raiz, enquanto que, em *C. tomentosum* e *L. muehlbergianus*, o maior acúmulo de nitrato foi observado nas raízes e a maior atividade da redutase de nitrato nas folhas.

Discute-se a importância das características ecológicas dessas quatro espécies de leguminosas com algumas variáveis fisiológicas, tratando de visualizar aspectos ecofisiológicos de interesse, com aplicabilidade nos sistemas florestais.

SUMMARY

In terms of composition and structure of tropical forests, legumes are the largest contributors due to the great diversity of genus and species in its three sub-families, Caesalpinioideae, Mimosoideae and Papilionoideae or Faboideae. Furthermore, legumes can associate with nitrogen fixing microorganisms forming root nodules and thereby contributing to nitrogen cycle, having great eco-physiological significance.

This work was divided into chapters, with a view to cover some of the aspects of growth, photosynthesis and nitrogen assimilation of four native legume trees species: *Centrolobium tomentosum* Marth., *Inga vera* Willd., *Lonchocarpus muehlbergianus* Hassl. (species that form root nodules) and *Myroxylon peruiferum* L.f. (specie that do not present root nodules).

In the chapter I, the growth of four species at 7 and 10 months of age was evaluated. In general, it was found that *I. vera* presented the greater shoot dry mass and nitrogen accumulation in the leaves and that *L. muehlbergianus* presented the greater root and nodule dry mass as well as the greater nitrogen accumulation in stem, roots and nodules. On the other hand, *M. peruiferum* presented the greater relative growth rate and the greater ratio of final/initial nitrogen accumulation in leaves, stem and roots. As for the net assimilation rate, significant differences for the four species were not found. These results suggest that even though *M. peruiferum* didn't present root nodules, it has greater capacity of incrementing its biomass more rapidly than other species, in the same period of time.

In chapter II, some aspects of the photosynthetic rate were evaluated along with variables related to photosynthesis, in plants with 6 and 7 months of age. It was supposed that, in general, all species had saturated heir photosynthetic capacity in the earlier hours of the morning, before the beginning of measurements, under relatively high light intensity. Even so,

the net CO₂ exchange rates, were relatively low when compared to other tree species. It was found that *I. vera* presented the greater stomatic conductance, transpiration and CO₂ assimilation rate for both ages than the other three species. The water use efficiency ratio in the studied species were greater than in other species and, among them, *C. tomentosum* presented the highest efficiency.

In the chapter III the activity of some enzymes related to nitrogen assimilation and some of its metabolic products were evaluated in plants of 10 months of age. It was found that in general *I. vera* presented the highest nitrogenase activity and greater glutamine synthetase and NADH-glutamate synthase activity even though it was not an ureide producer, while *L. muehlbergianus* appears to be an ureide producer. A large accumulation of nitrate was observed in the leaves of *I. vera* and *M. peruiferum*, but the nitrate reductase activity of these species was greater in the roots, while in *C. tomentosum* and *L. muehlbergianus* the greater accumulation of nitrate was observed in the roots and the greater activity of nitrate reductase in the leaves.

The importance of the ecological characteristics of these four legume species in terms of some physiological variables are discussed in order to recognise eco-physiological aspects of interest with applications in forest systems.

I. INTRODUÇÃO GERAL

Na heterogênea vegetação do Brasil, as leguminosas são muito bem representadas em diversidade e densidade em ecossistemas variados (Klinge & Rodrigues, 1971; Prance *et al.*, 1976; Moreira *et al.*, 1992). Além da sua diversidade, as leguminosas têm grande potencialidade e ocupam importância econômica ao nível mundial (Faria *et al.*, 1987; Elevitch & Wilkinson, 1998, 99).

A família Leguminosae é o terceiro maior grupo do reino vegetal, possui cerca de 714 gêneros e mais de 19.000 espécies conhecidas, sendo a maioria árvores tropicais (Corby, 1981; Doyle, 1994; Sprent, 1995, 2001). Classifica-se em três subfamílias: Caesalpinioideae (157 gêneros e 2500 espécies), Mimosoideae (78 gêneros e 3000 espécies) e Papilionoideae ou Faboideae (479 gêneros e 13500 espécies) (Polhill & Raven, 1981; Sprent, 2001), com hábitos de crescimento arbóreo, arbustivo e herbáceo (Hungria & Araújo, 1994; Sprent, 2001).

Devido à suscetibilidade dos ecossistemas das florestas tropicais úmidas, as leguminosas são consideradas como alternativas na silvicultura para a re-vegetação de áreas degradadas (Magalhães *et al.*, 1982), devido à sua capacidade de fixar nitrogênio atmosférico, o que é importante para o restabelecimento de árvores em solos com deficiência nutricional (Roggy & Prévost, 1999).

No presente estudo, os critérios de seleção para escolher as espécies de leguminosas arbóreas nativas foram a oferta de sementes na época da coleta e a sua relativa importância expressada pelo Índice de Valor de Importância (I.V.I.)¹, na Reserva Municipal de

¹ Índice de Valor de Importância (I.V.I.) é um valor do grau da importância das diferentes espécies da comunidade vegetal, que é determinado segundo os atributos ou parâmetros fitossociológicos (dominância, frequência e densidade) que caracteriza uma espécie individual e cuja somatória expressa a importância fisionômica dessa espécie em relação às outras espécies do mesmo ecossistema (Moeller-Dombois & ElleMBERG, 1974).

Santa Genebra, Campinas, SP, no Bosque dos Jequitibás, Campinas, SP, e em outras associações vegetais (Matthes, 1980, 1992; Morellato, 1991; Pinto *et al.*, 1997; Aidar, 2000; Gandolfi, 2000; J. Tamashiro, R. Rodrigues & G. Shepherd, comunicação pessoal). Estas espécies foram *Centrolobium tomentosum*, *Inga vera*, *Lonchocarpus muehlbergianus* e *Myroxylon peruiferum*.

Da subfamília Papilionoideae, o gênero *Centrolobium* Mart. ex Benth. apresenta fruto tipo sâmara indeiscente, com núcleo seminífero basal (Barroso *et al.*, 1999). A espécie *Centrolobium tomentosum* Mart. ex Benth, conhecida popularmente como araribá, araribá-rosa, aribá, araruva, ararauba, carijó, iriribá-rosa, putumuju ou tipirí, é uma árvore de 10 a 22 m de altura, com tronco de 30 a 60 cm de diâmetro e folhas compostas imparipinadas com 13 a 17 folíolos ferrugíneo-tomentosos na face inferior e pubescentes na superior. Ocorre em Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso do Sul, São Paulo e Norte do Paraná, na floresta semidecídua da bacia do Paraná e afluentes (Lorenzi, 1992), com ampla dispersão na mata atlântica (Lima, 1985). Segundo Lorenzi (1992), sua madeira é própria para marcenaria e carpintaria em geral. Pode ser utilizada como árvore ornamental, sendo empregada na arborização de ruas largas, praças e parques. É uma planta decídua, heliófita e seletiva xerófita. Como planta pioneira de rápido crescimento é ótima para plantios mistos destinados à recomposição de áreas degradadas de preservação permanente. No entanto, segundo Aidar (1992) e Sanches (1997), esta é uma espécie secundária, intolerante à sombra, cujas plântulas dependem da ocorrência de clareiras para ocupar novos locais, crescer e assim, atingir o dossel da mata. Matthes (1980) comentou que esta espécie apresentou um I.V.I. de 7,40, ocupando o terceiro lugar no Bosque dos Jequitibás, Campinas, SP. Produz anualmente grandes quantidades de sementes viáveis, que podem ser disseminadas pelo vento (Lorenzi, 1992). Floresce durante os meses de janeiro a março e os frutos amadurecem de junho a outubro

(Morellato, 1991). A emergência das sementes ocorre em 15 a 25 dias, o desenvolvimento das mudas é rápido e suas raízes apresentam nodulação (Faria *et al.*, 1984 a; Sprent, 2001).

O gênero *Myroxylon* L.f. (Papilionoideae) apresenta fruto tipo sâmara indeiscente, ala com venação longitudinal com núcleo seminífero apical internamente provido de bolsas resiníferas (Barroso *et al.*, 1999). *Myroxylon peruiferum* L.f., conhecida popularmente como cabreúva-vermelha, bálsamo, pau-de-incenso, caboreíba-vermelha, caboriba, pau-de-bálsamo, pau-vermelho, puá, bálsamo-caboriba, cabrúva, óleo-vermelho, óleo-cabreúva, sangue-de-gato ou quina-quina, é uma árvore de 10 a 20 m de altura, com tronco de 60 a 80 cm de diâmetro e folhas compostas pinadas, com 9 a 13 folíolos glabros na parte superior. Ocorre em quase todo o país, principalmente na floresta latifoliada semidecídua da bacia do Paraná, Mata Pluvial Atlântica da Bahia, Espírito Santo e zona da mata de Minas Gerais, floresta equatorial da parte sul e sudoeste da região Amazônica e até na caatinga do nordeste do país. A madeira é própria para mobiliário, para construção civil e o tronco fornece, por lesão, o bálsamo de tolu, empregado em perfumaria. É uma árvore ornamental utilizada no paisagismo, indiferente às condições físicas do solo e ótima para plantios em áreas degradadas de preservação permanente. É uma planta climácica (Rodrigues, 1995), de estágio tardio de sucessão, tolerante à sombra (Souza & Válio, 2001), decídua e heliófita, característica da floresta latifoliada semidecídua, ocorrendo tanto no interior da mata primária densa como nas formações secundárias. No estudo de Matthes (1980), apresentou um I.V.I. de 3,55, ocupando o 9º lugar no Bosque dos Jequitibás, Campinas, SP. Floresce de julho a setembro e os frutos amadurecem de outubro a novembro. A germinação é hipógea, característica comum a espécies tolerantes à sombra (Bazzaz & Pickett, 1980) e a emergência ocorre em 15 a 30 dias, com taxa germinativa superior a 50 % (Lorenzi, 1992). O desenvolvimento das mudas é rápido (Lorenzi, 1992) e não apresenta formação de nódulos radiculares (Sprent, 2001).

O gênero *Lonchocarpus* Kunth. (Papilionoideae) apresenta legume samaróide, fruto internamente não-septado com suturas desprovidas de expansões aliformes, mesocarpo parco ou indistinto e embrião com eixo hipocótilo-radícula curvo (Barroso *et al.*, 1999). *Lonchocarpus muehlbergianus* Hassl., conhecida popularmente como guaianã, embira-de-sapo, feijão-cru, timbó, rabo-de-bugiu, rabo-de-macaco, rabo-mole ou rabo-de-mico, é uma árvore ornamental de 15 a 25 m de altura, com tronco de 40 a 50 cm de diâmetro e folhas compostas imparipinadas, com 7 a 13 folíolos glabros na face superior e pubescentes e de cor mais clara na inferior. Ocorre em Minas Gerais, Mato Grosso do Sul até Rio Grande do Sul, principalmente na floresta latifoliada semidecídua da bacia do Paraná. A madeira é empregada para tabuado em geral. É uma planta considerada não tolerante à sombra, pioneira, decídua, característica das florestas semidecíduas (Cancian, 1999). Apresenta dispersão descontínua, preferindo solos profundos, férteis e úmidos, sendo considerada padrão de terra boa. Matthes (1980) comentou que esta espécie apresentou um I.V.I. de 0,34, ocupando o 93º lugar no Bosque dos Jequitibás, Campinas, SP. Produz grande quantidade de sementes viáveis. Floresce em outubro e a maturação dos frutos ocorre em dezembro. Apresenta alta taxa de germinação e esta ocorre de 15 a 25 dias. As mudas desenvolvem-se rapidamente (Lorenzi, 1992) e as raízes apresentam nodulação (Cordeiro *et al.*, 1996; Sprent, 2001).

O gênero *Inga* Mill. da subfamília Mimosoideae apresenta fruto deiscente tipo legume, valvas não septadas internamente após a deiscência, nem torcidas, nem contorcidas; o fruto se apresenta de plano-comprimido ou oblongo-elíptico a estreito com mais de 5 cm de comprimento; a semente não alada, sem pleurograma e sem arilo, apresenta sarcotesta e endosperma; a testa apresenta outra coloração diferente ao restante da semente; o embrião apresenta eixo hipocótilo-radícula reto (Barroso *et al.*, 1999). *Inga vera* Willd., conhecida como ingá-do-brejo, ingá-de-quatro-quinas, ingazeiro, ingá-banana, ingá ou angá, é uma

árvore de 5 a 10 m de altura, com tronco de 20 a 30 cm de diâmetro e folhas compostas paripinadas, de ráquis alada, pubescência restrita às nervuras e superfície inferior de cor mais clara. Ocorre de São Paulo até o Rio Grande do Sul, principalmente na floresta pluvial atlântica. Esta árvore é aproveitada para o paisagismo e sua madeira é empregada para obras e confecções de brinquedos. Produz grande quantidade de frutos comestíveis, tanto por homens como por animais. É uma planta pioneira, semidecídua, heliófita e seletiva higrófila, ótima para plantios mistos em áreas ciliares degradadas, planícies aluviais e beira de rios da floresta pluvial atlântica. Apresenta nítida preferência por solos bastantes úmidos e até brejosos, ocorrendo quase que exclusivamente em formações secundárias (capoeiras e capoeirões). Segundo Matthes (1980), esta espécie apresentou um I.V.I. de 0,33, ocupando o 94º lugar no Bosque dos Jequitibás, Campinas, SP e Pinto *et al.* (1997) comentou valores de 4,23 no Parque Nacional da Chapada, MT. Produz grande quantidade de sementes viáveis, que podem germinar rapidamente dentro da vagem. Floresce de agosto a novembro e a maturação dos frutos é de setembro a janeiro. A emergência ocorre de 3 a 5 dias, a germinação é total; o desenvolvimento das mudas é rápido (Lorenzi, 1992) e as raízes apresentam formação de nódulos radiculares (Pennington & Fernandes, 1998; Sprent, 2001).

II. OBJETIVOS GERAIS

1. Avaliar o crescimento inicial de *Centrolobium tomentosum*, *Inga vera*, *Lonchocarpus muehlbergianus* e *Myroxylon peruiferum* em condições de casa de vegetação e analisar a eficiência de N alocado às estruturas das espécies.
2. Determinar alguns aspectos relacionados à fotossíntese nas quatro espécies.
3. Determinar a atividade específica de algumas enzimas responsáveis pela assimilação do nitrogênio e relacionar com alguns metabólitos produzidos na assimilação do nitrogênio.

III. CAPÍTULO 1

CRESCIMENTO INICIAL DE QUATRO ESPÉCIES DE LEGUMINOSAS ARBÓREAS TROPICAIS

1. INTRODUÇÃO

O crescimento das plantas pode ser analisado em termos de incremento em massa, volume, comprimento ou área, envolvido na divisão, expansão e diferenciação do material protoplasmático vegetal, como consequência da interação de processos fisiológicos como fotossíntese, respiração, relações hídricas, disponibilidade de nutrientes, com os fatores ambientais. Poorter & Remkes (1990) comentaram que o incremento da biomassa também pode diferir consideravelmente entre as espécies, em virtude das diferenças de massa das sementes.

Hall *et al.* (1993) mencionaram que existem quatro fatores relacionados à fotossíntese que influenciam no incremento da biomassa: a quantidade de luz incidente, que é determinada pelo clima; a proporção da luz interceptada pelas organelas da planta, que depende da medida, estrutura e cor das partes que formam a planta; a eficiência da conversão fotossintética da luz interceptada pelas organelas, que é determinada diretamente pelos processos fotossintéticos, expressando a relação direta entre a produtividade e fotossíntese; e a perda de biomassa pela respiração, com finalidade de manter os tecidos e formar constantemente novos tecidos.

Por outro lado, Pearcy (1990) comentou que as plantas têm a capacidade de ajustar-se morfológica e fisiologicamente, quanto ao incremento da biomassa, como resposta às condições desfavoráveis de luz e vários autores (Gloser & Gloser, 1996; Wong & Stur, 1996;

Dias-Filho, 1999 e Nandal *et al.*, 1999) enfatizaram que esta capacidade de ajuste é a chave da determinação competitiva potencial, que pode variar entre as espécies em condições ambientais específicas.

Aproximadamente 90 % da MS das plantas são originados de produtos fixados a partir da A (Poorter *et al.*, 1990), ou seja, do C assimilado que não foi perdido na respiração. Neste sentido, o crescimento das plantas pode ser analisado como o incremento da MS total e a sua distribuição ou alocação nas diferentes estruturas envolvidas nos processos fisiológicos que resultam neste crescimento. Esta alocação dos recursos é importante na determinação da taxa de crescimento vegetal.

Segundo Larcher (2000), dentre outros autores, as medidas que são consideradas padrões para a análise de crescimento de uma espécie em particular são a MS total e a AF (ou conteúdo de clor). Watson (1947) relacionou estes dois parâmetros em uma equação matemática denominada TAL, que expressa o incremento da MS por unidade de tempo, durante um período de produção de fotoassimilados pelo sistema assimilatório representado pela AF. Deste modo, a TAL é o resultado do balanço líquido do C da fotossíntese e da respiração com respeito ao incremento da biomassa.

Por outro lado, Hunt (1982), dentre outros autores, com base no mesmo princípio matemático da TAL, expressam a TCR como a aumento da MS por unidade de tempo, com relação à MS inicial da planta. Na TCR implicitamente estão relacionadas a RAF, que refere-se à quantidade de AF por unidade de massa total da planta, a AFE que é a quantidade de AF por unidade de massa foliar e a TAL, anteriormente descrita. A TCR pode estar associada com a TAL, no sentido de refletir a A na quantidade de AF disponível para a interceptação de luz e na alocação da biomassa foliar (Lambers *et al.*, 1998).

Não só a entrada de C afeta o crescimento das plantas, são também importantes a eficiência da utilização da água e o suprimento adequado de nutrientes. Grime & Hunt (1975) e Lambers & Poorter (1992), mencionaram que as variações na TCR também ocorrem pela disponibilidade de nutrientes, pois em condições adequadas de nutrição, as plantas apresentam altos valores de TCR. Além disso, nas plantas existe estreita correlação entre o metabolismo de C e de N, pois a redução na disponibilidade de N, provoca diminuição da atividade fotossintética e, por conseguinte, diminuição da biomassa dada pela fixação de C (Osmond *et al.*, 1982).

Marschner (1995) comentou que dentre os elementos mais requeridos pelas células, depois do C, oxigênio e hidrogênio, obtidos pela *A* e absorção da água, o N representa de 1,3 a 6,0% da MS da planta. Além de ser utilizado na formação da Rubisco, o N é imprescindível para a formação das membranas dos tilacóides.

Segundo Hungria & Araújo (1994) o N existente nas plantas provem principalmente da decomposição da matéria orgânica e/ou do nitrogênio fornecido pelos fertilizantes no solo. O N pode também ser fornecido através da redução do N_2 atmosférico a NH_4^+ , que ocorre via FBN. A eficiência de utilização do N pelas plantas, crescendo com livre acesso aos nutrientes, é portanto, basicamente determinada pela absorção do NO_3^- e NH_4^+ através das raízes ou pela FBN que ocorre nos nódulos radiculares e pela capacidade de mobilizar, alocar ou armazenar o N nos diferentes órgãos da planta, com a finalidade de disponibilizá-lo ao longo do crescimento (Pimentel, 1998; Lambers *et al.*, 1998). A relação de eficiência do N é a produção de biomassa com relação ao suprimento de N e é definida como a razão entre a biomassa e a quantidade de N presente nessa biomassa. Siddigi & Glass (1981) comentaram que a eficiência de absorção pelas raízes é tão importante quanto a eficiência de utilização do N absorvido. Estes autores desenvolveram um outro índice que permite relacionar o incremento

da biomassa com o conteúdo de N absorvido em um determinado período de produção. Este índice denominado IEUN foi definido como a biomassa ao quadrado sobre a concentração do N no tecido vegetal.

O objetivo específico deste capítulo foi avaliar o crescimento inicial de plantas de *Centrolobium tomentosum*, *Inga vera*, *Lonchocarpus muehlbergianus* e *Myroxylon peruiferum*, em condições de casa de vegetação e analisar a eficiência de utilização do N translocado às diferentes estruturas das plantas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal

Foram utilizadas sementes de *Centrolobium tomentosum* Mart. ex Benth. (*Centrolobium*), coletadas na Reserva Municipal de Santa Genebra, Campinas, SP, em outubro de 2000; *Lonchocarpus muehlbergianus* Hassl. (*Lonchocarpus*), coletadas no Parque Ecológico "Arboretum" da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), em setembro de 2000; *Myroxylon peruiferum* L.f. (*Myroxylon*) e *Inga vera* Willd. (*Inga*), coletadas na área que circunda o Instituto de Biologia (IB) da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, em setembro de 2000 e em janeiro de 2001, respectivamente.

2.2. Germinação das sementes e condições de cultivo

As asas de 208 frutos de *Centrolobium* e 455 frutos de *Myroxylon* foram cortadas e as sâmaras colocadas para germinar em bandejas de plástico sem qualquer tipo de substrato. Estas sâmaras foram lavadas diariamente com água corrente e em seguida mantidas ao ar livre para secar (ISTA, 1966). Este procedimento foi contínuo até a última germinação acontecer. Conforme germinavam, as sementes foram sendo transferidas para bandejas contendo vermiculita lavada. O critério para se considerar a semente germinada foi a protrusão da radícula (Davidovich, 1980).

As sementes de *Lonchocarpus* e *Inga* foram separadas dos frutos e, após remoção manual do endocarpo de *Inga*, foram desinfetadas com hipoclorito de sódio diluído a 1% por 5 min e colocadas diretamente em bandejas de plástico contendo vermiculita lavada.

Todas as bandejas foram mantidas em casa de vegetação do Departamento de Fisiologia Vegetal do IB da UNICAMP, sob condições de luz e temperatura naturais. Diariamente, foram registradas as temperaturas máximas e mínimas com um termômetro de máximas e mínimas (INCOTERM).

2.3. Coleta de nódulos, isolamento de rizóbios e produção de inoculantes

Um mês depois da germinação, quando as plântulas já estavam estabelecidas, foram transferidas para vasos de plástico contendo 5,0 L de solo proveniente da Reserva Municipal de Santa Genebra, para propiciar a formação de nódulos radiculares por infecção das raízes com rizóbios nativos.

Quatro meses após o plantio, algumas plantas de *Centrolobium*, *Inga* e *Lonchocarpus* foram coletadas para observar a ocorrência de nódulos nos sistemas radiculares. Os nódulos foram retirados, desinfetados, cortados ao meio e alguns dos que apresentavam coloração vermelha no interior, foram utilizados para isolamento das estirpes dos rizóbios e posterior preparação de inoculantes, segundo os métodos de Vincent (1970). A superfície exposta dos nódulos cortados ao meio foram passadas, com auxílio de uma pinça esterilizada, sobre placas de Petri contendo meio de cultura 79 sólido (Fred & Waskman, 1928). Ao meio foi adicionado o colorante vermelho-congo a 0,25%, para a identificação da pureza das colônias de rizóbios ou azul de bromotimol a 0,5%, para verificar se o crescimento das bactérias era rápido ou lento (Vincent, 1970). As placas foram incubadas no escuro, em estufa a 28 °C (Roughley & Pulsford, 1982) e o crescimento e as características das colônias formadas foram observados diariamente.

Após o isolamento, as colônias foram transferidas individualmente para tubos de ensaio contendo meio 79 sólido inclinado e, após o tempo suficiente para crescimento em estufa a 28°C as culturas foram mantidas em geladeira a 8 °C.

Para a produção de inoculantes, parte do isolado foi transferido para erlenmeyers contendo meio de cultura 79 líquido (Vincent, 1970) e estes foram colocados no escuro a 25°C, sob agitação constante (Mesa com agitação orbital, MARCONI) até obtenção de uma suspensão de rizóbios, para posteriormente ser utilizada para inocular os vasos contendo as plantas em estudo. Todos estes procedimentos foram realizados sob câmara asséptica de fluxo laminar (VECO).

Para garantir a nodulação efetiva das três espécies que apresentaram nódulos radiculares, os mesmos lotes de plantas obtidas a partir da germinação, aos quatro meses de idade, foram inoculados com os inoculantes produzidos. Em cada vaso foram aplicados 5 mL de inoculante do isolado correspondente a cada espécie. Este procedimento foi realizado novamente quando as plantas atingiram cinco meses de idade.

2.4. Avaliação do crescimento das plantas

Aos sete e dez meses de idade, 15 plantas de cada uma das espécies foram selecionadas, coletadas e separadas em raízes, folhas (lâminas foliares), caule com pecíolos e nódulos. Após determinação da AF, com um integrador (LI-COR, modelo LI-300), todo o material foi colocado para secagem em estufa (FANEM LTDA) a 80 °C por 48 h para posterior determinação da MS em balança analítica (MARTE).

A área foliar específica (AFE), razão de massa foliar (RMF), razão de área foliar (RAF), taxa média de crescimento relativo (TCR) e taxa média de assimilação líquida (TAL) foram

calculadas segundo as fórmulas utilizadas por Hunt (1982) e a relação dos nódulos (como estruturas fixadoras de nitrogênio atmosférico) com a MS total da planta, foi calculada como Razão de Massa Nodular (RMNod):

$$AFE = \frac{AF}{MS \text{ folhas}} \text{ (dm}^2\text{/g)}$$

$$RMF = \frac{MS \text{ folhas}}{MS \text{ total}} \text{ (g/g)}$$

$$RAF = \frac{AF}{MS \text{ total}} \text{ (dm}^2\text{/g)}$$

$$\overline{TAL} = \frac{MS2 - MS1}{t2 - t1} \frac{\ln AF2 - \ln AF1}{AF2 - AF1} \text{ (mg/cm}^2\text{.dia)}$$

$$\overline{TCR} = \frac{\ln MS2 - \ln MS1}{t2 - t1} \text{ (mg/g.dia)}$$

$$\overline{RMNod} = \frac{MS \text{ nódulos}}{MS \text{ total}} \text{ (g/g)}$$

Onde:

MS1 = massa seca total no tempo t1 (mg)

MS2 = massa seca total no tempo t2 (mg)

AF1 = área foliar total no tempo t1 (cm²)

AF2 = área foliar total no tempo t2 (cm²)

t1 = tempo da primeira coleta (dias)

t2 = tempo da segunda coleta (dias)

2.5. Análise do nitrogênio total

Amostras de folhas, caules, nódulos e raízes de plantas com 7 e 10 meses de idade, secas em estufa a 60 °C, foram moídas em moinho de bola para determinação de N total no Laboratório de Microbiologia do Instituto Agronômico de Campinas. Utilizou-se a técnica semi-micro Kjeldahl, desenvolvida por Bremner (1965a), seguida por destilação a vapor e titulação para quantificação de amônio.

O incremento do N total de 7 a 10 meses de idade, foi calculado por meio da razão final/inicial (f/i) do N total. Igualmente foi calculada a relação de eficiência do N (REN), segundo Esteves (1985), para expressar a quantidade de MS produzida por unidade de N:

$$REN = \frac{MS \text{ total (g)}}{N \text{ total (mg)}} \times 1000$$

Para calcular o índice de eficiência de utilização do nitrogênio (IEUN), aplicou-se a equação desenvolvida por Siddigi & Glass (1981):

$$IEUN = \frac{(MS)^2}{N \text{ acum.}} \quad (g^2/g \text{ N.planta})$$

$$N \text{ acum.} = \frac{N \text{ total (g N)}}{MS \text{ planta}} \quad (g \text{ N/MS planta})$$

2.6. Análise estatística

Foi utilizada análise de variância simples, seguida do cálculo da diferença mínima significativa (DMS) pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade. Utilizou-se o programa estatístico VARPC.

Os dados de germinação em porcentagem foram transformados para arco-seno $\sqrt{p}$; sendo p a proporção de sementes germinadas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Germinação das sementes

A germinação das sementes de *Inga* foi rápida e atingiu 100% em 2 dias (fig. 1.1), como efetivamente foi observado por Lorenzi (1992). Para a germinação das sementes de *Centrolobium*, a lavagem diária e posterior secagem das sâmaras ao ar livre permitiu que a água amolecesse o exocarpo espinhoso do fruto e a alternância de temperaturas tornasse permeável o tegumento, propiciando, aos dez dias após o início do tratamento, a germinação acumulada de 76,3% (fig. 1.1). O tratamento de lavagem e secagem teve duração de 49 dias, quando todas as sementes viáveis já haviam germinado.

Nos frutos de *Myroxylon*, este mesmo tratamento de lavagem e secagem diárias permitiu eliminar a proteção do exocarpo e a cumarina presente na semente. Mesmo sendo a cumarina considerada um inibidor de germinação de outras sementes (Inenami *et al.*, 1984) parece ter sido relevante para as próprias sementes de *Myroxylon* eliminá-la parcialmente para a germinação do embrião. No entanto, é possível que outros fatores como o aumento da permeabilidade do tegumento também tenham influenciado a germinação destas sementes. A primeira germinação aconteceu aos 23 dias após início do tratamento, mas o tratamento de lavagem e secagem teve duração total de 68 dias, até a germinação de todas as sementes viáveis, obtendo-se uma germinação acumulada de 44,5% (fig. 1.1). Souza (1996) comentou que as sementes de *Myroxylon* começaram a germinar aos 5 dias após colocadas em caixas gerbox, alcançando 72% de germinação em condições de laboratório. Em condições de campo, em bandejas contendo terra, a germinação alcançou 17,5%, com início da germinação quase aos 30 dias.

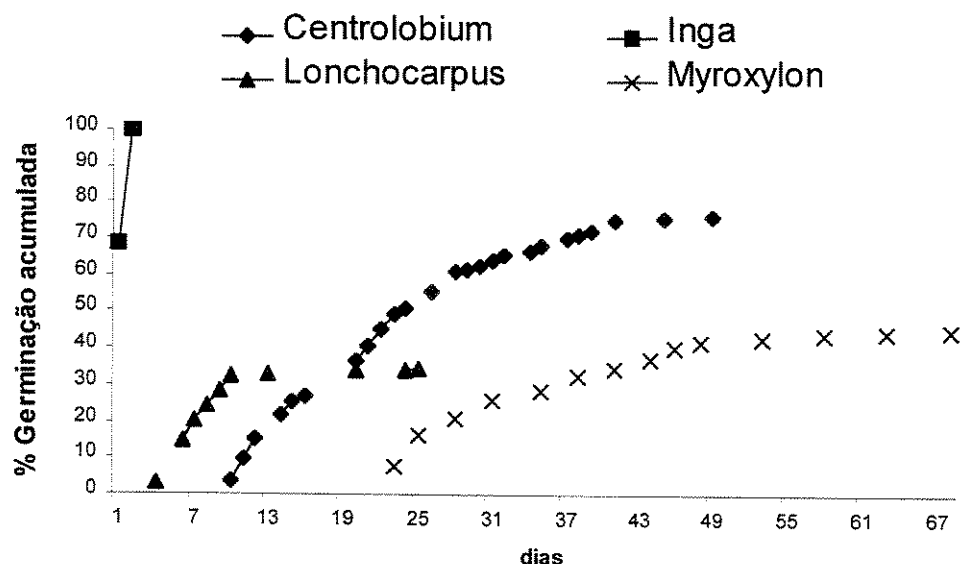


Figura 1.1. Curvas de porcentagem de germinação acumulada sob condições de casa de vegetação no Departamento de Fisiologia Vegetal, IB (UNICAMP).

As sementes de *Lonchocarpus* começaram a germinar aos 4 dias após a semeadura e a porcentagem de germinação acumulada foi de 34,5% em 25 dias (fig. 1.1). Cancian (1999) mencionou 60% de germinação máxima para esta espécie, com início do processo aos 11 dias após a semeadura.

3.2. Avaliação do crescimento das plantas

Na casa de vegetação, a temperatura máxima média foi de $34,5^{\circ}\text{C} \pm 2,7$; a temperatura mínima média foi de $18,2^{\circ}\text{C} \pm 3,0^{\circ}\text{C}$ e o registro das temperaturas médias registradas às 9:00h da manhã foi de $28,6^{\circ}\text{C} \pm 2,4^{\circ}\text{C}$. As temperaturas mais altas foram registradas nos meses de janeiro a abril e os registros de temperaturas mais baixas de maio até julho de 2001 (fig. VIII.1, do apêndice).

Observou-se nódulos de tipo indeterminado em plantas de *Inga* e *Lonchocarpus*, enquanto para *Centrolobium* os nódulos foram de tipo determinado, redondos de grande tamanho e coloração interna vermelha. Os nódulos das plantas de *Inga* e *Lonchocarpus*, apresentaram forma cilíndrica ou ramificada, com mais de um meristema e coloração interna variando entre branco (parte apical), vermelho (parte mediana) e marrom (zona senescente). Nódulos semelhantes foram observados por Cordeiro *et al.* (1996) e Gross *et al.* (2002) em plantas de *Lonchocarpus* e de angico-do-cerrado, respectivamente.

Comparando-se o crescimento das espécies estudadas aos 7 e 10 meses de idade, observou-se que *Myroxylon* e *Inga* apresentaram, aos 7 meses de idade o maior número de folhas. Aos 10 meses, *Myroxylon* continuou apresentando o maior número de folhas, sobressaindo-se às outras três espécies (fig. 1.2A). A razão número de folhas final/inicial foi maior para *Myroxylon*, enquanto que para as outras espécies esta razão foi estatisticamente igual (fig. 1.2B).

Inga apresentou a maior altura do caule em ambas idades (fig. 1.2C), porém a razão altura de caule final/inicial foi estatisticamente igual para *Inga*, *Lonchocarpus* e *Myroxylon* (fig. 1.2D). Souza (1996) comentou que *Myroxylon* apresentou maior crescimento em altura do caule sob condições da casa de vegetação quando comparada com outras 15 espécies arbóreas nativas diferentes das estudadas neste trabalho.

Quanto à MS de cada estrutura das plantas, observou-se que *Inga* e *Lonchocarpus* apresentaram maiores valores para folhas e caule aos 7 meses de idade. Aos 10 meses de idade *Inga* apresentou a maior MS (figs. 1.3A e 1.3B). *Lonchocarpus* apresentou a maior MS de raízes nas duas idades (fig. 1.3C) e a maior MS nodular aos 7 meses de idade (fig. 1.3D). Aos

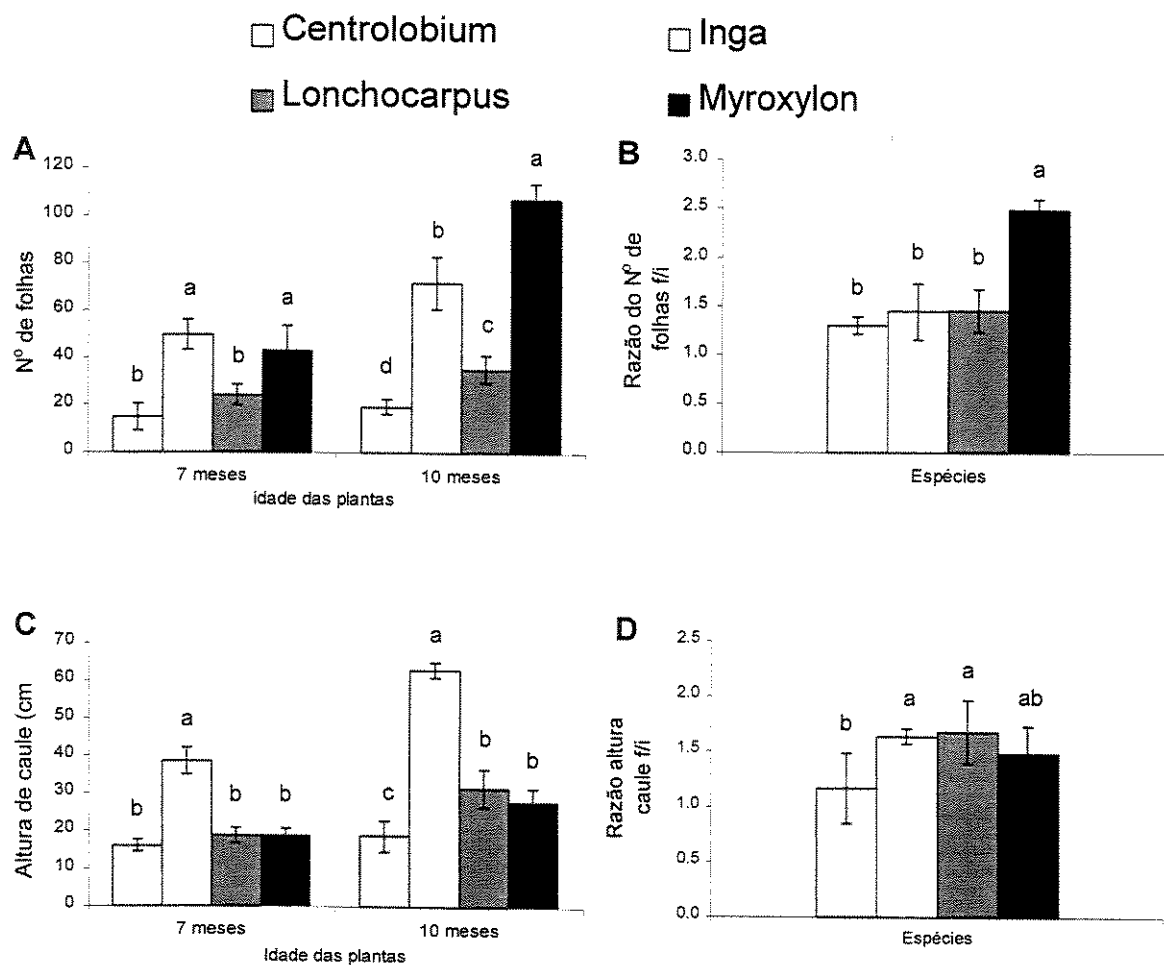


Figura 1.2. Avaliação do número de folhas (A), razão do número de folhas final/inicial (B), altura do caule (C) e razão da altura do caule final/inicial (D), nas espécies estudadas, aos 7 e aos 10 meses de idade. Tukey a 5 % de probabilidade. As letras comparam as diferentes espécies, dentro de cada idade.

10 meses de idade, a MS nodular de Lonchocarpus e Inga e de Centrolobium e Inga foram estatisticamente iguais (fig. 1.3D). Lonchocarpus apresentou a maior MS total (fig. 1.3E) em consequência da grande MS de raízes (vide fig. 1.3C). Em Myroxylon, o maior incremento da MS foi refletido na maior TCR desta espécie em relação às outras (fig. 1.3F).

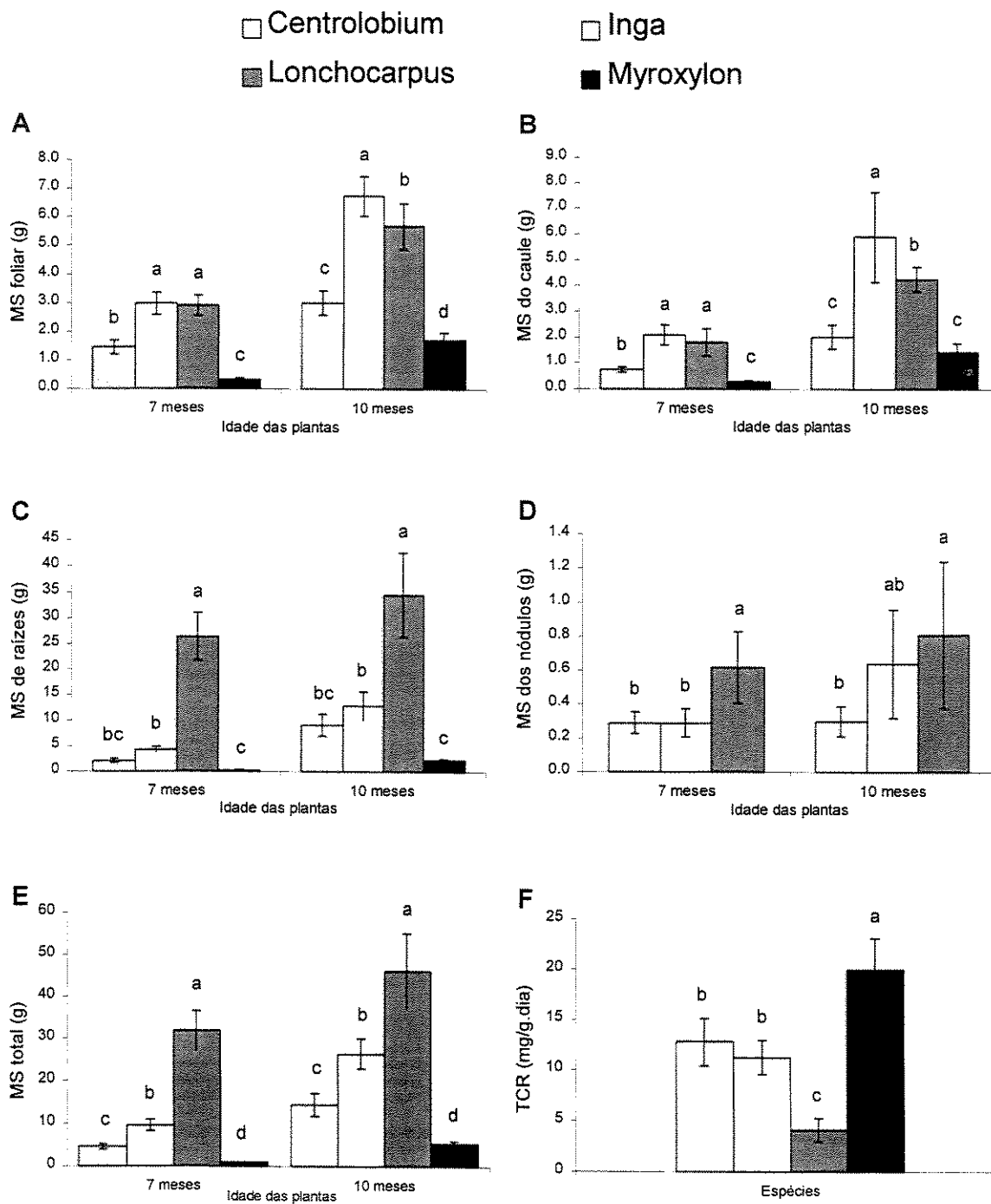


Figura 1.3. Avaliação de MS foliar (A), MS do caule (B), MS das raízes (C), MS de nódulos (D) e MS total da planta (E), aos 7 e aos 10 meses de idade, e TCR (F) nas espécies estudadas. Tukey a 5% de probabilidade. As letras comparam as diferentes espécies. No caso de MS, as comparações foram feitas dentro de cada idade.

Cancian (1999) mencionou que *Lonchocarpus* apresentou maior acúmulo de MS em raízes que na parte aérea e que a maior contribuição para o incremento de MS no sistema radicular foi devido ao maior comprimento em extensão da raiz principal e a seu maior desenvolvimento em diâmetro.

Quanto à AF, *Inga* apresentou maior AF total aos 7 meses e *Lonchocarpus* aos 10 meses (fig. 1.4A). No entanto, a maior razão de AF total final/inicial foi observada em *Myroxylon*, enquanto que nas outras espécies esta razão foi estatisticamente igual (fig. 1.4B). *Myroxylon* apresentou também a maior RAF e a maior AFE aos 10 meses de idade, enquanto que, aos 7 meses de idade, os maiores valores foram encontrados em *Centrolobium* (fig. 1.4C e 1.4D). *Lonchocarpus* que teve a menor RAF nas duas idades (fig. 1.4C) apresentou uma razão raiz/parte aérea muito maior que as outras três espécies, as quais não diferiram entre si aos 7 meses de idade (fig. 1.4E). Nesta mesma idade, *Centrolobium* e *Inga* apresentaram MS de parte aérea e raízes, praticamente iguais (fig. 1.4E). Aos 10 meses de idade, a razão raiz/parte aérea de *Centrolobium* aumentou e esta espécie destacou-se em relação a *Inga* e a *Myroxylon*. Em *Myroxylon*, em ambas as idades, a MS da parte aérea foi um pouco maior que a MS das raízes (fig. 1.4E).

Com respeito à TAL não foram observadas diferenças significativas entre as espécies estudadas (fig. 1.4F).

Quanto à proporção entre as diferentes partes da planta, observou-se que *Myroxylon* apresentou maior RMF e RMC em ambas as idades, embora, aos 10 meses, *Inga* tenha apresentado RMC estatisticamente igual a *Myroxylon* (figs. 1.5A e 1.5B). *Lonchocarpus*, que apresentou as menores RMF e RMC, teve a maior RMR em ambas as idades (fig. 1.5C). *Centrolobium* apresentou a maior RMNod aos 7 meses de idade, mas aos 10 meses de idade, não foram observadas diferenças significativas entre as 3 espécies (fig. 1.5D).

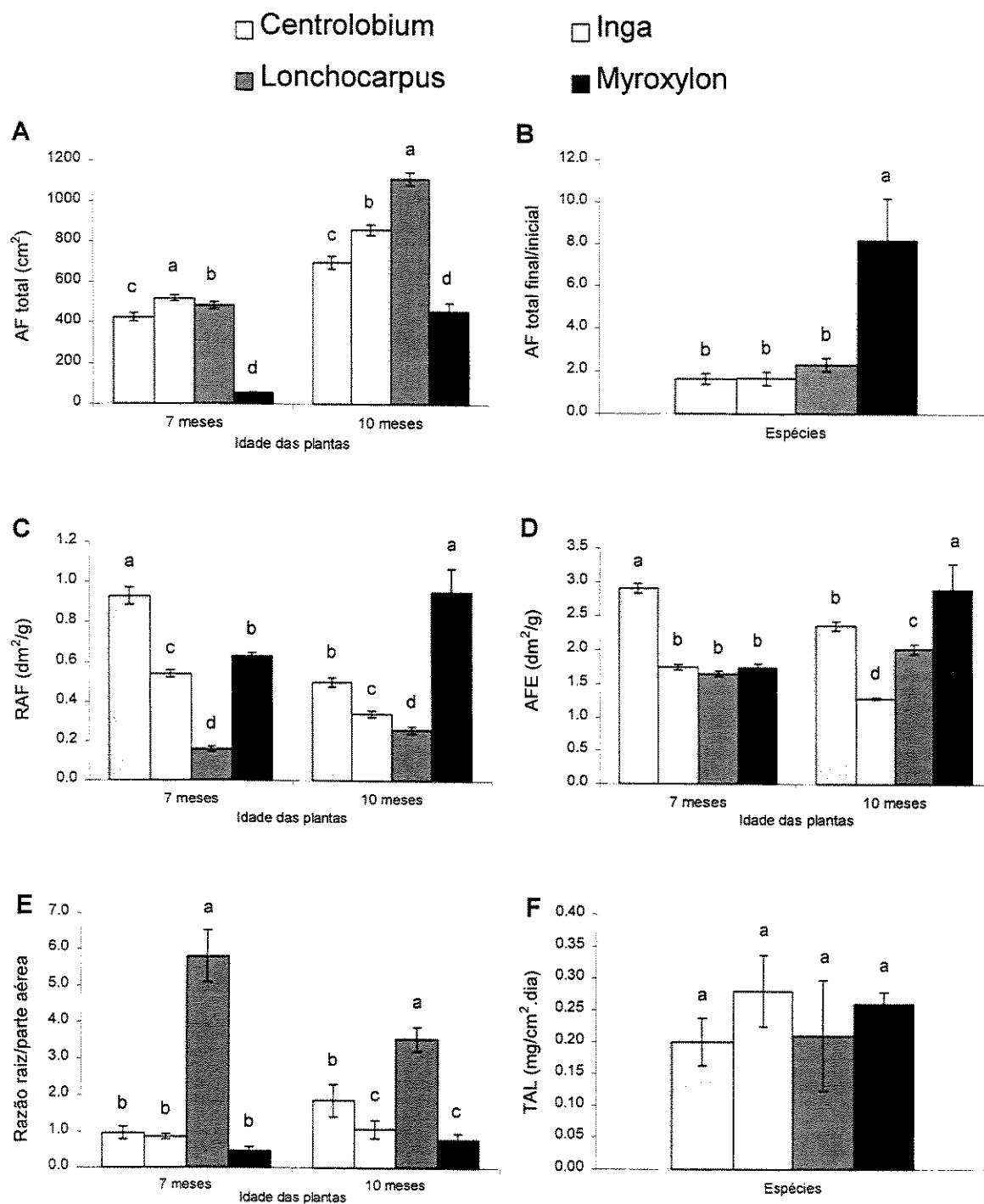


Figura 1.4. Avaliação da AF total (A), AF total final/inicial (B), RAF (C), AFE (D), razão raiz/parte área (E) e TAL (F), nas espécies estudadas. Tukey a 5% de probabilidade. As letras comparam as diferentes espécies, dentro de cada idade, quando for o caso.

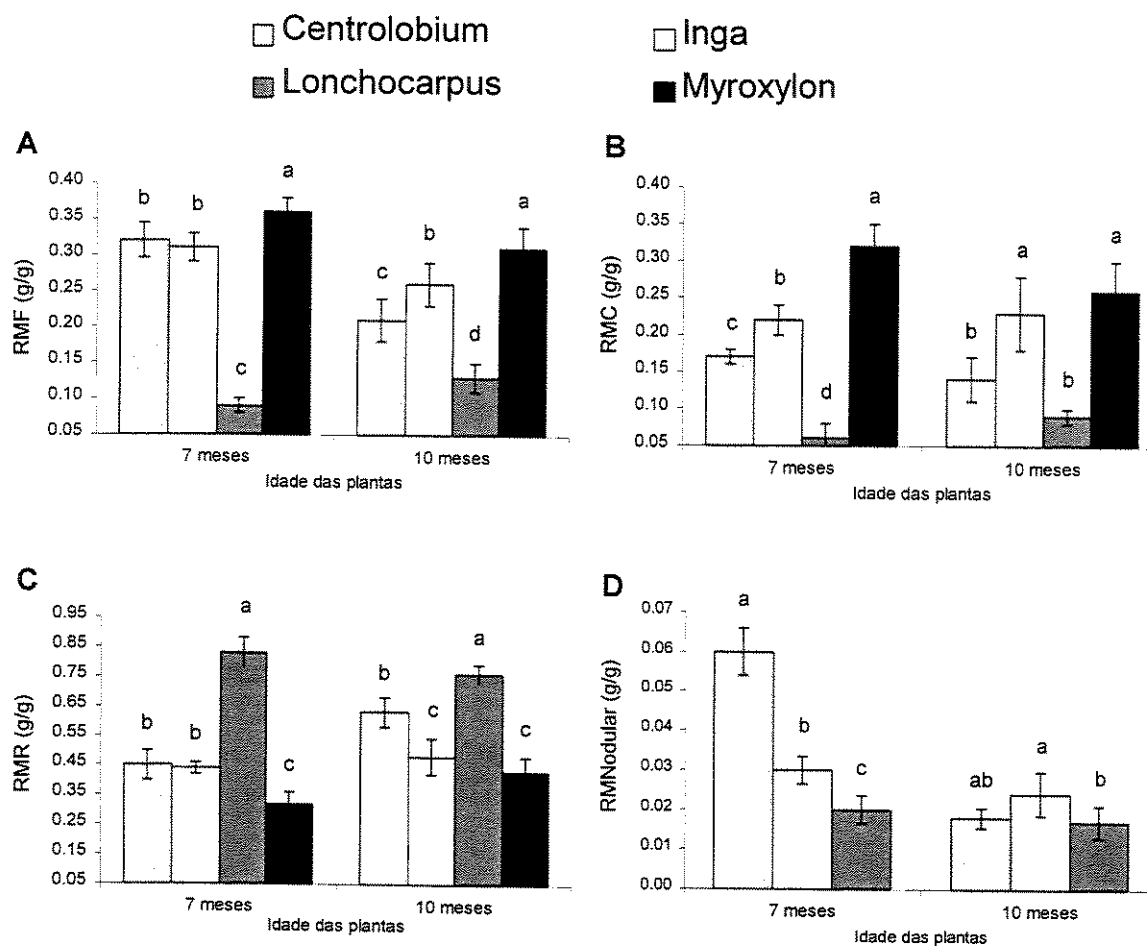


Figura 1.5. Avaliação da RMF (A), RMC (B), RMR (C) e RMNod (E), nas espécies estudadas. Tukey a 5% de probabilidade. As letras comparam as diferentes espécies, dentro de cada idade.

Sabe-se que AFE é a quantidade de AF por unidade de massa foliar, RMF é a fração da massa total alocada às folhas e RAF representa a dimensão relativa do aparelho fotossintético da planta (Corré, 1983). Observando-se que Myroxylon foi a espécie que apresentou o maior incremento em número de folhas no período de tempo avaliado (maior razão de número de folhas final/inicial) e as maiores razões de AF total final/inicial (ganho em MS e AF), verifica-

se que isso foi realmente refletido em maiores RMF, RAF e AFE nessa espécie. Lambers *et al.* (1998) e Poorter & Remkes (1990), comentaram que a RAF, sendo produto da AFE com RMF, está diretamente relacionada a variáveis da TCR e que, em caso de maiores RAF, AFE ou RMF, a TCR também será maior. Isto foi efetivamente constatado pela maior TCR encontrada para *Myroxylon*.

No caso de *Lonchocarpus*, a razão de AF total final/inicial foi menor que a de *Myroxylon* e o incremento em massa foliar no período de tempo avaliado também, o que foi refletido em menores RMF, RAF e AFE. Lambers *et al.* (1998) comentam que quando a AFE diminui, também diminui a quantidade de AF disponível para a interceptação de luz, por conseguinte, diminui o ganho líquido de C e, por sua vez, a TCR será menor, como aconteceu com *Lonchocarpus* cuja TCR foi a menor das espécies estudadas.

Poorter & Remkes (1990) comentaram que o rápido crescimento das espécies com alto AFE e altas TCR, aparentemente produz folhas com baixo investimento em biomassa, o que poderia explicar em parte a menor MS foliar encontrada em *Myroxylon* em ambas as idades. Além disso, estes mesmos autores mencionaram que as diferenças na AFE entre espécies podem ser devidas a fatores morfológicos, gerados pelo genótipo da espécie (como engrossamento foliar, dentre outros) e Wang *et al.* (1994) complementaram que as alterações nos parâmetros relacionados à morfologia foliar (RAF, RMF e AFE) observadas com o aumento da idade das plantas, revelam a capacidade de adaptação das folhas às condições variáveis de radiação ao longo do crescimento e desenvolvimento da planta.

Vários dos parâmetros de crescimento caracterizam os estádios de sucessão das espécies, segundo o ecossistema em que elas se encontrarem. É assim, que Rodrigues (1995) concluiu que *Myroxylon* é uma espécie climácica ou de sucessão tardia, nas suas observações feitas na Reserva de Santa Genebra, Campinas, SP. Entende-se como espécie pioneira ou de sucessão

inicial aquela que coloniza primeiramente os ambientes perturbados e espécie climácica ou de sucessão tardia, aquela que consegue se instalar finalmente na substituição sequencial da sucessão no interior da floresta. No entanto, analisando *Myroxylon* em condições de casa de vegetação, poder-se-ia pensar que trata-se de uma espécie pioneira. Ramakrishnan *et al.* (1982) comentaram que as espécies iniciais possuem maior altura que as espécies tardias, apresentam maior crescimento em extensão do caule e maior produção de folhas (RMF). *Myroxylon* crescendo sob condições de casa de vegetação, apresentou crescimento do caule relativamente alto e maior RMF aos 10 meses de idade, características de espécies iniciais. Bazzar & Picket (1980) comentaram que as espécies iniciais têm maior TCR, ou seja, crescem mais rápido que as tardias e esta também foi uma característica apresentada por *Myroxylon*. Walters *et al.* (1993) e Kitajima (1994) mencionaram que espécies iniciais alocam menos biomassa para o sistema radicular. *Myroxylon* apresentou esta característica e as outras três espécies alocaram mais biomassa para as raízes, o que é próprio de espécies tardias, possivelmente para facilitar a captação de nutrientes.

Os mesmos autores anteriormente citados, mencionaram que espécies intolerantes à sombra parecem apresentar maior RAF, maior AFE e maior RMF, que as espécies tolerantes. Consideram-se espécies tolerantes à sombra, aquelas que não necessitam de clareiras para regenerar-se e que geralmente são espécies de estádios tardios de sucessão; e espécies intolerantes à sombra, aquelas iniciais, que precisam de maior radiação solar para crescer (Hartshorn, 1980). *Myroxylon* é citada como tolerante à sombra, mas segundo os parâmetros apresentados em condições de casa de vegetação, maior RAF, maior AFE e maior RMF, comporta-se como espécie não necessariamente tolerante à sombra. Esta observação foi corroborada por Souza & Válio (2001) que comentaram que *Myroxylon* não apresentou diferenças significativas no crescimento, em tratamentos com sombreamento ou radiação

plena. Por outro lado, Loach (1970) mencionou que a TAL é maior em espécies intolerantes à sombra e a TAL de *Myroxylon* não foi significativamente diferente das TAL das outras três espécies, portanto essa espécie não é necessariamente tolerante à sombra.

Segundo Lambers & Poorter (1992) e Lambers *et al.* (1998) as vantagens ecológicas das espécies iniciais que possuem altas TCR são a rápida ocupação de espaços perturbados e a maior competição pelos recursos que são limitados no solo.

Quanto à análise do N total, apresentado como N acum., observou-se que *Inga* e *Lonchocarpus* apresentaram mais N acum. em folhas aos 7 meses de idade e que aos 10 meses de idade *Inga* apresentou maior concentração de N em folhas que as outras espécies (fig. 1.6A). *Lonchocarpus* teve maior acúmulo de N em caule (fig. 1.6B), raízes (fig. 1.6C), nódulos (fig. 1.6D) e na planta toda (fig. 1.6E), em ambas as idades. Mas, o incremento de N acum. no período de tempo avaliado em *Myroxylon* (razão final/inicial) foi maior para todas as estruturas da planta (figs 1.7A, 1.7B, 1.7C e 1.7E). Em relação aos nódulos, a maior razão final/inicial foi encontrada em *Lonchocarpus* (fig. 1.7D).

Miranda (2002) encontrou em plantas de *Crotalaria juncea* com 2 meses de idade, inoculadas e sem tratamento com N mineral, valores de 0,14 g N/g MS foliar, 0,12 g N/g MS radicular e 0,44 g N/g MS nodular. Isto indica a variabilidade existente nas leguminosas na assimilação de N absorvido e assimilado, pois este N pode ser rapidamente translocado para estruturas novas, favorecendo em distintos graus, o desenvolvimento vegetativo (Heichel & Vance, 1983; Buttery & Dirks, 1987; Brown & Walsh, 1994). Esta translocação possivelmente pode ser confirmado nas raízes de *Lonchocarpus*.

Quanto à REN (tab. 1.1), *Myroxylon* apresentou o maior valor para ambas as idades. Esteves (1985), com base em vários autores enfatizou que, quanto maior o quociente de

eficiência, maior é a utilização do N na produção de MS. Isto efetivamente foi observado em Myroxyton, que apresentou a maior TCR no período de tempo avaliado (vide fig. 1.3F).

Tabela 1.1. Relação de eficiência do N nas espécies estudadas, aos 7 e 10 meses de idade.

REN	Espécies			
Idade (meses) (g MS/ mg N)	Centrolobium	Inga	Lonchocarpus	Myroxyton
7	45,70	40,85	44,05	80,91
10	50,28	47,81	42,39	86,94

Na análise de eficiência de utilização do N apresentada como índice (IEUN), observou-se que Lonchocarpus apresentou o maior valor em ambas as idades (fig. 1.6F), embora Myroxyton tenha apresentado a maior razão de IEUN corroborando a REN (fig. 1.7F e tab. 1.1).

Segundo Poorter *et al.* (1990), Lambers & Poorter (1992) e Poorter & Jong (1999), espécies com altas TCR e AFE são caracterizadas por altas concentrações de N acumulado em folhas e raízes. Em Myroxyton foi observada, não só a maior TCR, como também a maior razão final/inicial de N acumulado, tanto nas folhas como em caule e raízes.

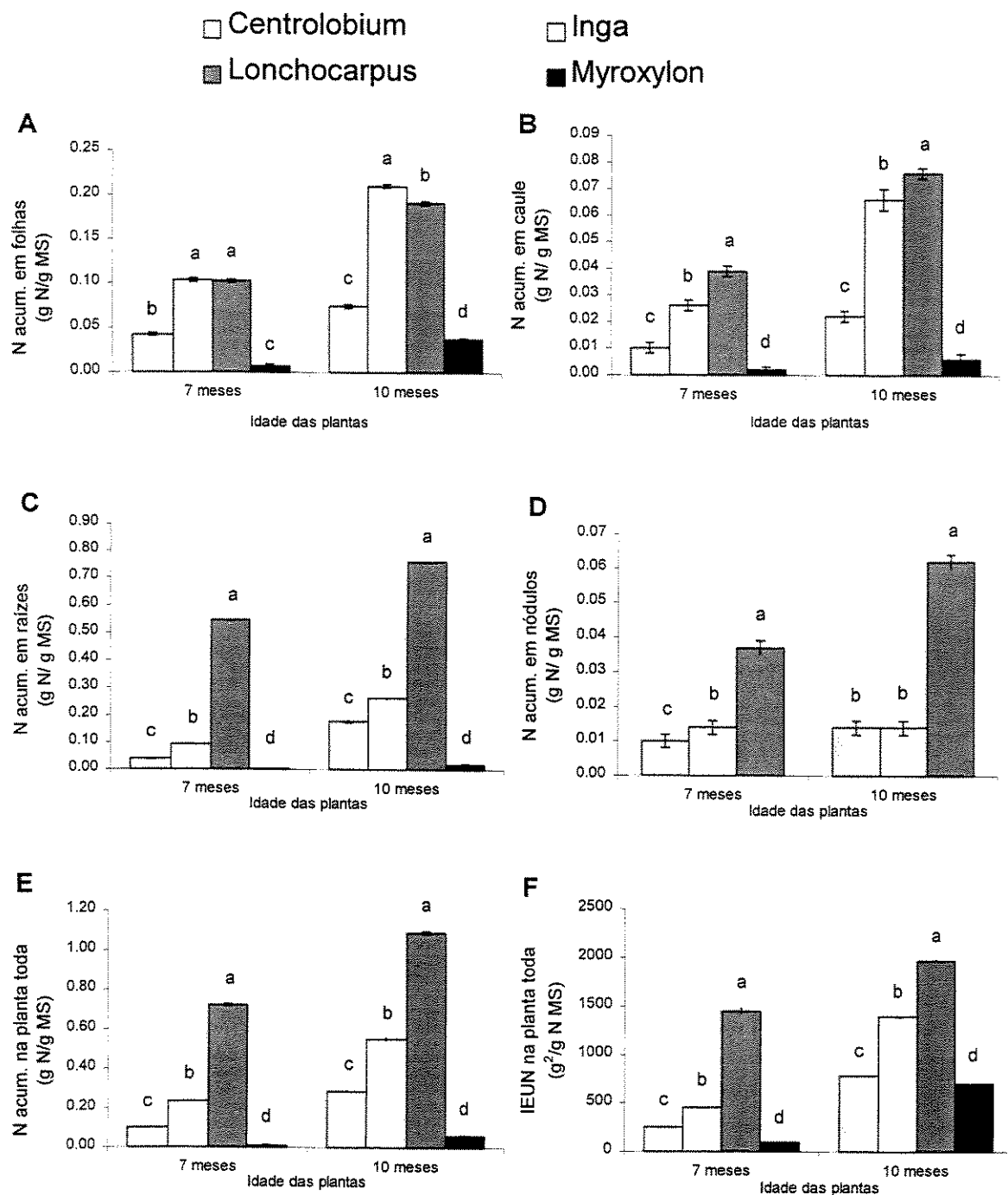


Figura 1.6. Avaliação do N acum. em folhas (A), caule (B), raízes (C), nódulos (D), planta toda (E) e IEUN na planta toda (F), nas espécies estudadas, aos 7 e aos 10 meses de idade. Tukey a 5% de probabilidade. As letras comparam as diferentes espécies dentro de cada idade.

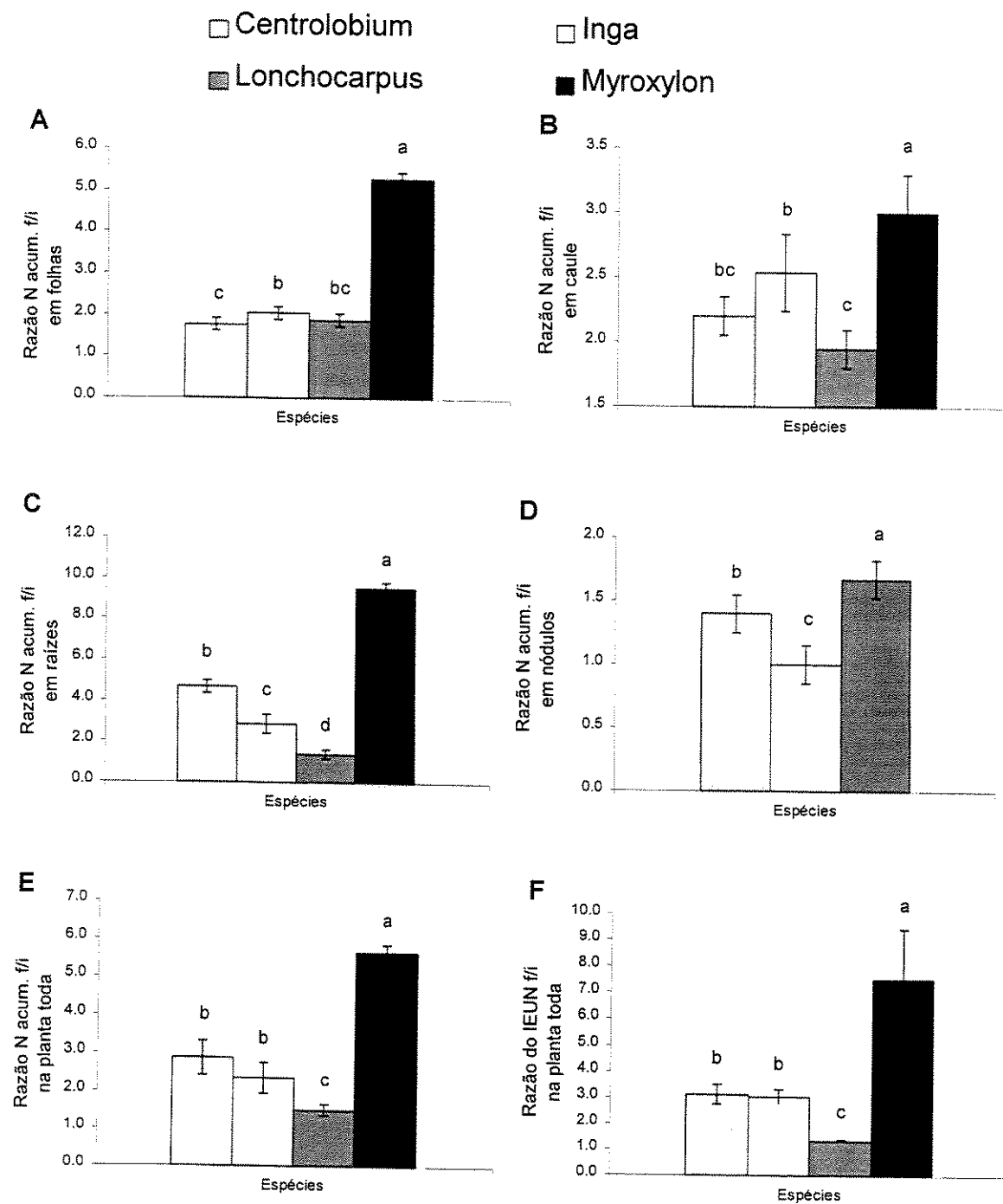


Figura 1.7. Avaliação da razão de N acum. final/inicial em folhas (A), caule (B), raízes (C), nódulos (D) e na planta toda (E) e razão final/inicial do IEUN da planta toda (F), nas espécies estudadas. Tukey a 5% de probabilidade. As letras comparam as diferentes espécies.

IV. CAPÍTULO 2

ASPECTOS DA FOTOSSÍNTESE EM QUATRO ESPÉCIES DE LEGUMINOSAS ARBÓREAS TROPICAIS

1. INTRODUÇÃO

Vários estudos envolvendo trocas gasosas têm sido realizados com diferentes espécies arbóreas sob condições naturais (Tenhunen *et al.*, 1981; Pereira *et al.*, 1986; Zotz *et al.*, 1995; Ishida *et al.*, 1996, 1999; Eschenbach *et al.*, 1998; Peñuelas *et al.*, 1998). Segundo González-Rodríguez (2002), este tipo de estudo é dificultado devido à variabilidade dos fatores ambientais. Contudo, pesquisas básicas como estas ajudam a esclarecer as relações entre os indivíduos de uma comunidade e podem ser úteis em projetos de conservação, proteção e recuperação.

Em plantas lenhosas a taxa fotossintética é variável, podendo oscilar, sob condições naturais, entre 3 e 30 $\mu\text{mol}/\text{m}^2.\text{s}$ (Ceulemans & Saugier, 1991), devido às diferenças no comportamento de cada espécie e flutuações nas condições ambientais. Larcher (2002) observou que, em geral, as taxas fotossintéticas em árvores tropicais de florestas chuvosas são relativamente altas, oscilando entre 10 e 16 $\mu\text{mol}/\text{m}^2.\text{s}$, enquanto que em árvores de zonas temperadas, variam de 6 a 12 $\mu\text{mol}/\text{m}^2.\text{s}$.

A primeira etapa do processo fotossintético ocorre nos cloroplastos. Nestas estruturas alocadas no mesófilo foliar, distingue-se três fases: 1) absorção de fótons pelas clorofilas e carotenóides. Estes dois pigmentos estão localizados nas membranas dos tilacóides e absorvem a maior parte da energia da radiação fotossinteticamente ativa (*PAR*), cujo

comprimento de onda vai de 400 até 700 nm. A energia de excitação é transferida aos centros de reação dos fotossistemas, onde ocorre a segunda fase; 2) os elétrons derivados da ruptura da água com a simultânea produção de O_2 , são transportados ao longo de uma cadeia transportadora de elétrons alojada na membrana do tilacóide. O NADPH e ATP produzidos nesta reação são utilizados na terceira fase fotossintética; 3) na fase de carboxilação do ciclo de Calvin, o CO_2 e H_2O são incorporados à Ribulose-1,5-bifosfato (RuBP) para formar 2 moléculas de ácido fosforilado de 3 carbonos (ácido-3-fosfoglicérico, 3-PGA), em uma reação catalisada pela Rubisco. Na fase de redução do ciclo de Calvin, o grupo carboxílico do 3-PGA se reduz a um grupo de éster de anidro de ácido (ácido 1,3-bisfosfoglicérico, 1,3-bisPGA) por adição do grupo fosfato terminal do ATP proveniente da fase dois, enquanto que o NADPH, igualmente proveniente dessa fase, atua como agente redutor, doando 2 elétrons ao átomo superior que forma parte do grupo éster anidro, liberando o P_i e produzindo 3-fosfogliceraldeído (3-PGald). Em cada três voltas do ciclo de Calvin se fixam três moléculas de CO_2 , com produção líquida de um 3-PGald. Algumas moléculas de 3-PGald são utilizadas nos cloroplastos para formar amido, o qual é armazenado nos próprios cloroplastos; este amido pode ser hidrolizado durante a noite e o produto ser exportado para o citosol. Outras moléculas de 3-PGald são transportadas fora dos cloroplastos para o citosol, onde são usados para produzir sacarose e outros metabólitos que serão exportados via floema (Azcon-Bieto & Talon, 1993; Lambers *et al.*, 1998; Taiz & Zeiger, 1998).

As diferenças na capacidade fotossintética das plantas são resultado das variações de fatores ambientais como luz, CO_2 , temperatura, disponibilidade de água e nutrientes e da idade da folha. Cada espécie apresenta diferenças específicas sob condições ótimas, segundo seu genotipo (Lambers *et al.*, 1998). As mudanças diárias dos fatores ambientais influenciam a fotossíntese, bem como as variáveis associadas a ela (*gs*, *E*, *Ci*). Além disso, a Rubisco

catalisa a carboxilação e oxigenação da RuBP e esta catálise depende das concentrações relativas de CO_2 e O_2 e da temperatura da folha. Segundo Xu & Shen (1996), a resposta fotossintética apresenta um pico máximo ao meio-dia, o que é típico para qualquer espécie vegetal. Em dias de alto déficit de pressão de vapor a fotossíntese registra dois picos máximos antes e depois do meio-dia, apresentando depressão do meio-dia. Em dias com severo déficit de pressão de vapor, quando as folhas excedem temperaturas altas, registra-se só um pico máximo seguido de várias depressões, detectado no período da manhã, quando a umidade do ar é alta.

As plantas respondem à deficiência da **PAR** com mudanças em seu metabolismo, na morfologia foliar, na orientação das folhas ou no alongamento do caule, para evitar sombreamento e desta maneira tornar máxima a interceptação da luz (Frankland, 1986). A presença simultânea de clorofilas e carotenóides amplia a gama de fótons visíveis que podem ser absorvidos (Azcon-Bieto & Talon, 1993), mas quando os níveis de irradiância são muito altos, os carotenóides, que além de funcionarem como pigmentos coletores de luz, também protegem as clorofilas contra o excesso de luz solar, absorvendo a energia excedente e liberando-a em forma de calor (Salisbury & Ross, 1994). Baixas intensidades luminosas provocam estresse nas plantas, porque a irradiância limita a fotossíntese e, deste modo, o ganho líquido de C refletido no crescimento da planta. Mas, altas intensidades luminosas também provocam estresse, causando danos no aparelho fotossintético.

O fechamento estomático é considerado o principal fator do declínio da taxa fotossintética, e é freqüentemente acompanhado pela redução na ***Ci*** (Farquhar & Sharkey, 1982). O suprimento de CO_2 aos cloroplastos é um processo de difusão que se dá através dos estômatos. Ao amanhecer os estômatos geralmente se abrem relativamente rápido, permitindo a entrada do CO_2 que seria utilizado na fotossíntese durante o dia e durante o entardecer se

fecham gradualmente. A entrada de CO_2 determina a C_i , e esta, segundo Sharkey & Raschke (1981), em baixas intensidades luminosas, pode converter-se em um fator regulador que vai aumentando com o aumento da irradiância, mantendo os estômatos abertos. Em altas intensidades luminosas, esta resposta direta pode aumentar muito a concentração de CO_2 necessário à fotossíntese. Baixas C_i também promovem a abertura dos estômatos e altas C_i , provocam fechamento parcial dos estômatos, tanto na luz como no escuro (Lambers *et al.*, 1998).

Temperaturas elevadas provocam fechamento dos estômatos, mas podem acarretar aumento na taxa respiratória, o que provocaria um incremento no C_i , provocando fechamento estomático. Segundo Lambers *et al.* (1998), em algumas espécies as temperaturas elevadas provocam a abertura dos estômatos em vez de seu fechamento o que conduziria ao aumento da transpiração e redução da temperatura externa da folha. O efeito da temperatura sobre a fotossíntese depende da espécie, das condições ambientais em que estas cresceram e das condições ambientais durante as medições. Em geral, a temperatura ótima para a fotossíntese é similar à temperatura em que a planta cresce, exceto em ambientes frios, onde as temperaturas das folhas são superiores à temperatura do ar.

Por outro lado, os estômatos são sensíveis à umidade atmosférica e fecham-se quando a diferença entre o conteúdo de vapor da água do ar e dos espaços intercelulares supera níveis críticos. Quando este gradiente elevado induz ao fechamento estomático, o CO_2 na folha se esgota o que provocaria a abertura dos estômatos. Igualmente, quando a disponibilidade de água na planta decresce, ocorre fechamento estomático para evitar perda da água, o que provocaria diminuição da difusão de CO_2 , limitando as reações da fase escura da fotossíntese.

A fotossíntese de uma folha não aumenta ou diminui de maneira instantânea com a variação da irradiação. Esta resposta não imediata ao aumento da irradiação, conhecida como

efeito de indução, é controlada basicamente pelas mudanças na g_s , sendo que C_i permanece relativamente elevada durante as primeiras fases do efeito de indução. Enquanto isto acontece, a Rubisco uma vez ativada pela luz, pode promover a fixação de CO_2 , que começa com muita rapidez e diminui uma vez que tenha alcançado a saturação.

À medida que uma folha cresce, sua capacidade fotossintética aumenta até o desenvolvimento completo da folha, depois, esta capacidade vai diminuindo à medida que a folha vai ficando senescente. Isto acontece porque nas plantas existe correlação entre o metabolismo de N e o metabolismo de C, ocorrendo diminuição na A com a diminuição da disponibilidade de N (Osmond *et al.*, 1982). Com aumento da disponibilidade de N, há aumento proporcional da atividade da Rubisco e da assimilação de C até atingir a saturação. Como a assimilação do CO_2 é diretamente proporcional ao conteúdo de N foliar, durante a ontogenia, este teor de N vai diminuindo e ocorrem as mesmas variações na Rubisco (Dalling, 1985). Igualmente, o metabolismo de C depende do metabolismo de N para a síntese de enzimas de carboxilação e o metabolismo de N depende do fornecimento dos ácidos orgânicos, ATP e NADH, oriundos do metabolismo de C (Ritcher, 1993). Do mesmo modo, a atividade fotossintética exerce efeito sobre a FBN, uma vez que os carboidratos produzidos pela fotossíntese fornecem a energia para o crescimento e funcionamento dos nódulos (Hunt & Layzell, 1993; Sangakkara, 1994).

O objetivo específico deste capítulo foi determinar alguns aspectos relacionados à fotossíntese em *Centrolobium tomentosum*, *Inga vera*, *Lonchocarpus muehlbergianus* e *Myroxylon peruiferum*, em condições de casa de vegetação.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material vegetal e condições de cultivo

Foram utilizadas plantas com seis e sete meses de idade, de *Centrolobium tomentosum* Mart. ex Benth. (*Centrolobium*), cultivadas a partir de sementes coletadas na Reserva Municipal de Santa Genebra, Campinas, SP, *Inga vera* Willd (Inga), *Lonchocarpus muehlbergianus* Hassl. (*Lonchocarpus*) e *Myroxylon peruiferum* L.f. (*Myroxylon*), cultivadas a partir de sementes coletadas na Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Estas espécies foram mantidas em vasos de 5 L, contendo solo proveniente da Reserva Municipal de Santa Genebra, Campinas, SP, sob condições naturais de luz e temperatura, em casa de vegetação do Instituto de Biologia (UNICAMP). Todas as espécies, exceto *Myroxylon* que não forma nódulos radiculares, foram previamente inoculadas com isolados de rizóbios nativos provenientes do solo da Reserva de Santa Genebra.

2.2. Atividade fotossintética e variáveis relacionadas com a fotossíntese

A fotossíntese foi medida como taxa líquida de trocas de CO₂ (*A*), através do Sistema de Fotossíntese Portátil - IRGA (Infra-Red Gas Analyser) em sistema aberto (LCA-4 ADC, Analytical Development Company Limited). Simultaneamente, com o mesmo IRGA, obteve-se as seguintes variáveis relacionadas com a *A*:

T sup. folha = temperatura superficial da folha (°C)

PAR = radiação fotossinteticamente ativa incidente na superfície foliar (densidade de fluxo de fótons) ($\mu\text{mol fótons/m}^2.\text{s}$)

gs = condutância estomática ($\text{mol/m}^2.\text{s}$)

E = taxa de transpiração ($\text{mmol/m}^2.\text{s}$)

Ci = CO_2 subestomático ($\mu\text{mol/mol}$)

As medidas da *A* foram realizadas fora da casa de vegetação, em dias de céu claro, sob radiação plena, das 9:00 às 14:00 h, nos períodos de maio e junho de 2001. Foram utilizadas repetições de 3 plantas para cada espécie e as medidas foram realizadas em quatro folhas expandidas, respeitando o grau de inclinação destas, com 3 sub-repetições para cada folha, a intervalos de 10 a 15 s. A área parcial das folhas, pré-determinada na câmara foliar do IRGA, é de $6,25 \text{ cm}^2$. Para análise dos dados escolheu-se só aqueles dias que apresentaram as melhores características de radiação, dentre os vários dias de medição.

Com a finalidade de comparar as diferentes variáveis da fotossíntese, no período de tempo em que foram medidas, foram calculadas as integrais definidas das correspondentes equações de regressão polinomial de 2º ordem das linhas de tendência, como as somas algébricas da área delimitada pela curva $Y = f(X)$ (onde *f* pode ser **PAR**, **gs**, **Ci**, **E** ou *A*), entre o intervalo de integração *a* (1) como limite inferior e *b* (5) como limite superior, no período de 9:00 h a 14:00 h (Spiegel, 1972).

Calculou-se a eficiência do uso da água (EUA) de acordo com a razão utilizada por Souza *et al.* (2001):

$$\text{EUA} = \frac{A}{E} \quad (\mu\text{mol CO}_2/\text{mol H}_2\text{O})$$

2.2.1. Conteúdo de clorofila

Após a obtenção das variáveis das trocas gasosas, as mesmas folhas foram utilizadas para extração de pigmentos, segundo Hiscox & Israelstam (1978). Foram retirados discos foliares de área conhecida (0,7854 cm²/disco) e estes foram imersos em 7,0 mL de dimetil-sulfóxido (DMSO), em tubos com tampa de rosca. Os tubos foram deixados no escuro em banho-maria a 65 °C por 30 min e resfriados no escuro em temperatura ambiente. As leituras da densidade óptica foram determinadas em espectrofotômetro (Pharmacia Biotech. Ultrospec 1000) a 470, 663 e 645 nm. Foram realizadas 8 repetições para cada espécie. Réplicas de discos foliares com as mesmas áreas, foram retiradas e submetidas à secagem por 48 h em estufa a 80 °C, para obtenção da MS.

Os cálculos dos teores de clorofila e carotenóides, expressos em mg/g MS, foram feitos de acordo com as equações de Arnon (1949) e Lichtenthaler (1987):

$$\text{Clor a} = \frac{(12,7 \cdot A_{663} - 2,69 \cdot A_{645})}{1000 \text{ MS}} \cdot V$$

$$\text{Clor. b} = \frac{(22,9 \cdot A_{645} - 4,68 \cdot A_{663})}{1000 \text{ MS}} \cdot V$$

$$\text{Clor. total} = \frac{(20,2 \cdot A_{645} + 8,02 \cdot A_{663})}{1000 \text{ MS}} \cdot V$$

$$\text{Carotenóides} = \frac{(1000 \cdot A_{470}) - (1,82 \cdot \text{clor. a}) - (85,02 \cdot \text{clor. b})}{198} \cdot V$$

Onde:

A470 = absorbância a 470 nm

A663 = absorbância a 663 nm

A645 = absorbância a 645 nm

V = volume da amostra (mL)

MS = massa seca da amostra (g)

Os valores em mg/g MS foram convertidos em mg/cm², pela fórmula:

$$\text{Clor. (mg/cm}^2\text{)} = \frac{\text{Clor. (mg/g MS)} \times \text{MS discos}}{\text{A discos}}$$

Onde:

MS discos = massa seca média dos discos foliares (g)

A discos = área de um disco foliar (cm²)

Além disto, calculou-se a razão entre a taxa líquida de trocas de CO₂ em função da quantidade de clor. em unidades de área foliar.

2.3. Análise estatística

Foi realizada análise de variância simples, seguida do cálculo da diferença mínima significativa (DMS) pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade. Foi utilizado o programa estatístico VARPC.

As curvas de tendência para *PAR*, *gs*, *E*, *Ci* e *A* em função da hora foram submetidas à regressão polinomial de 2ª ordem.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Atividade fotossintética e variáveis relacionadas com a fotossíntese

Os meses de maio e junho corresponderam aos mais frios durante o ano 2001 (figura VIII.1 do apêndice). Nestes meses, as plantas perderam algumas das folhas mais velhas, dado que não foi registrado quantitativamente. O céu, no geral, permaneceu sem nuvens, a umidade relativa do ar variou de 45 % às 9:00 h a 20 % às 14:00 h (dados registrados no IRGA); a $T_{sup. folha}$, dentro da câmara do IRGA, foi de 30 °C às 9:00 h até 40 °C às 12:00 h (figura 2.1A e 2.1B). A PAR , das 9:00 às 14:00 h, oscilou de 900 a 1400 $\mu\text{mol/m}^2.\text{s}$ em ambos os meses, observando-se maior valor integral no mês de maio (plantas com 6 meses de idade) que no mês de junho/2001 (plantas com 7 meses de idade) (figuras 2.1C e 2.1D).

Estes fatores abióticos, dentre outros, influenciaram as respostas fotossintéticas das espécies. Observou-se que *Inga* teve maiores valores integrados de PAR , g_s , E e A , em ambas as idades, que as outras três espécies (figs. 2.2 e 2.3).

Analisando-se as espécie em função dos horários de medida, observou-se que a tendência da g_s para *Inga*, *Centrolobium* e *Lonchocarpus*, foi de diminuir ao longo do período. A g_s nestas espécies de 9:00–10:00 h começou mais alta que em *Myroxylon*, cujo maior valor registrou-se de 10:00 a 11:00 h aos 6 meses e das 11:00 às 12:00 h aos 7 meses. Mesmo com os valores da g_s diminuindo, os estômatos permaneceram parcialmente abertos para permitir a entrada do CO_2 mas, em *Lonchocarpus* foi observado fechamento completo dos estômatos no intervalo de 12:00 a 14:00 h e em *Myroxylon* de 13:00 a 14:00 h (fig. 2.2A).

A diminuição da g_s foi obedecendo ao aumento gradual da $T_{sup.}$ da folha, possivelmente

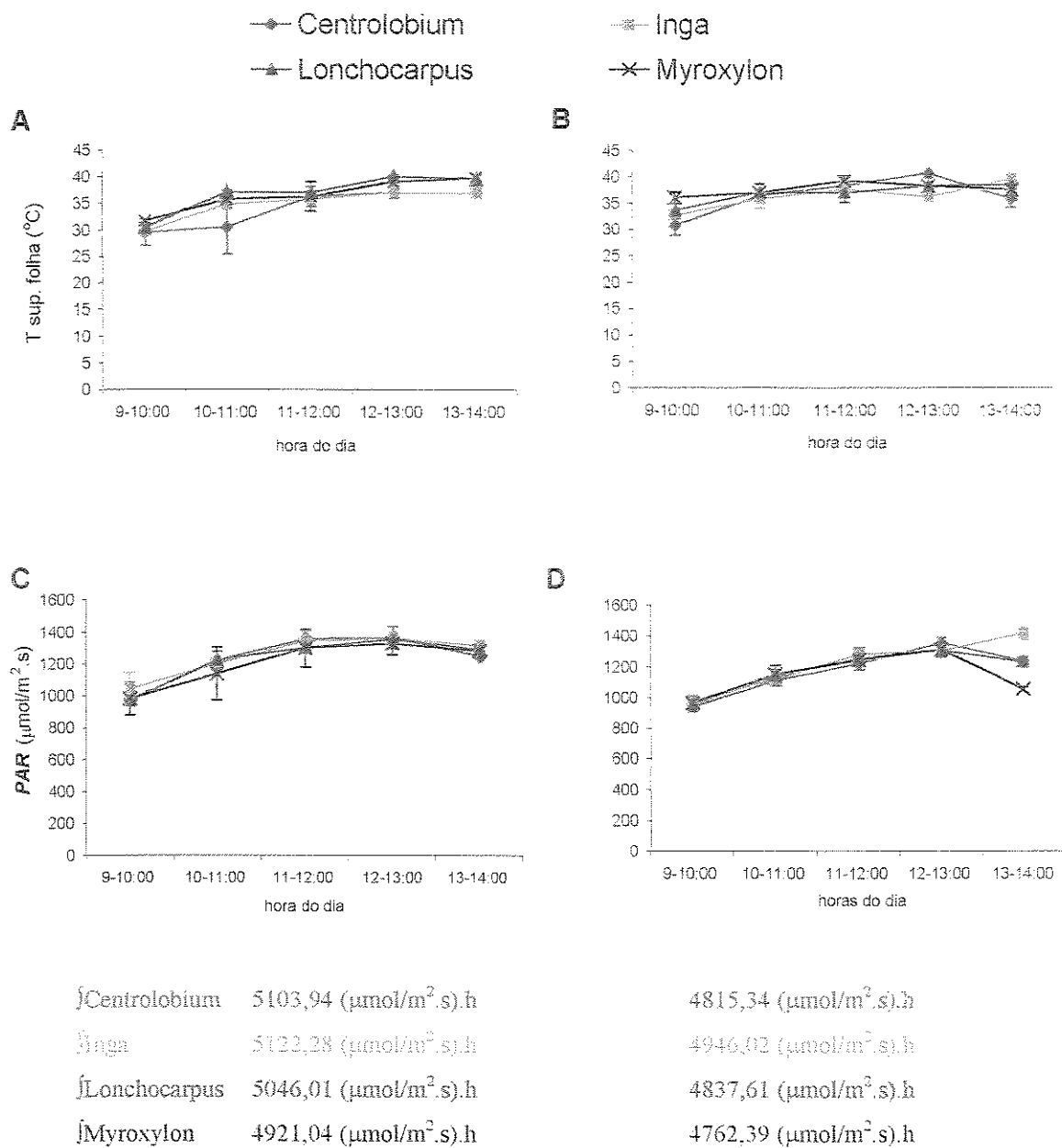


Figura 2.1. Curvas da T sup. folha das espécies estudadas e da *PAR* com seus respectivos valores integrados, aos 6 meses (A e C) e aos 7 meses (B e D) de idade. Cada ponto representa a média de 36 medidas (12/planta) realizadas no intervalo de 1 hora.

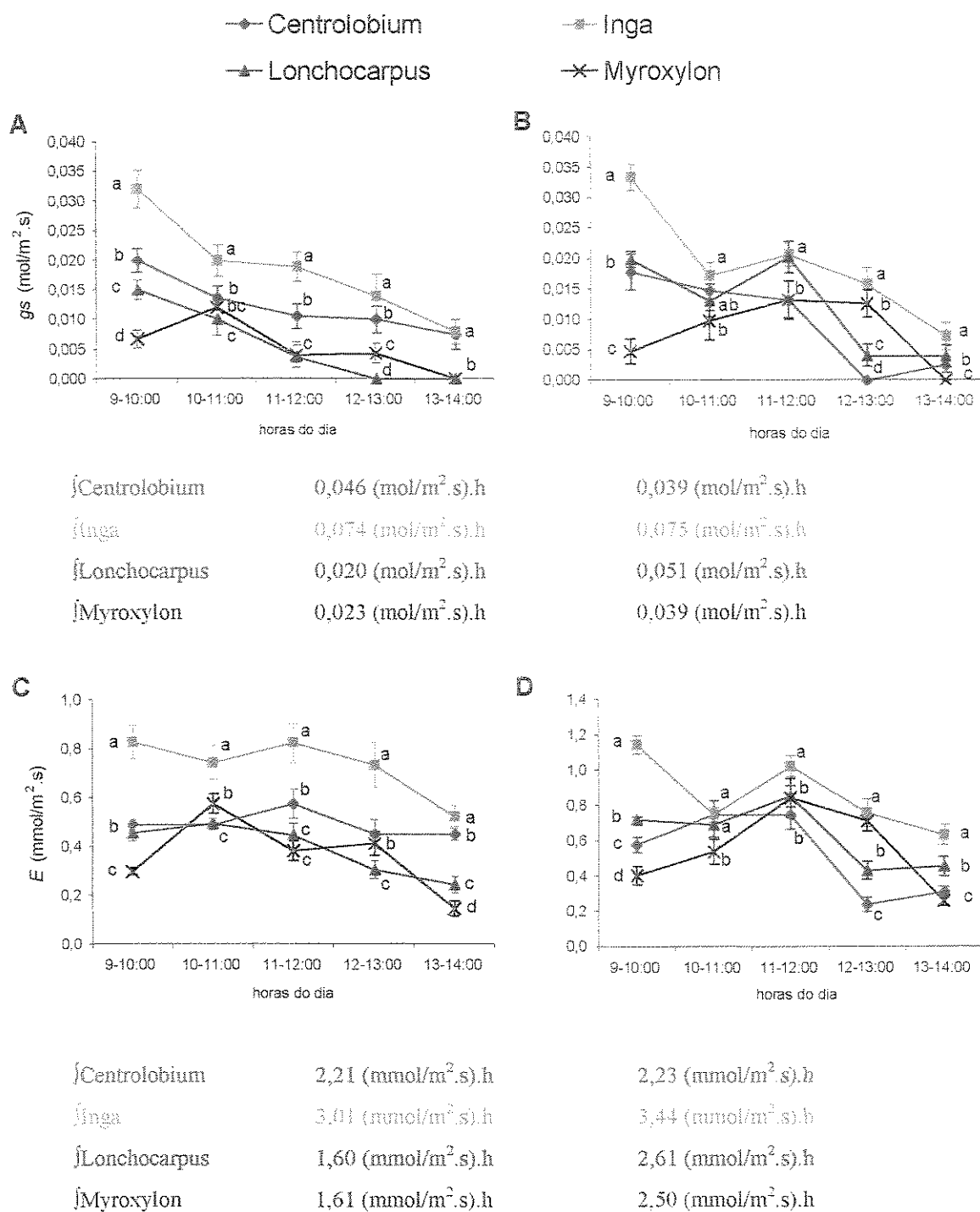


Figura 2.2. Curvas de gs e E das espécies estudadas, aos 6 meses (A e C) e aos 7 meses (B e D) de idade, com seus respectivos valores integrados. Cada ponto representa a média de 36 medidas (12/planta) realizadas no intervalo de 1 hora. Tukey a 5 % de probabilidade. As letras comparam as diferentes espécies, dentro de cada horário.

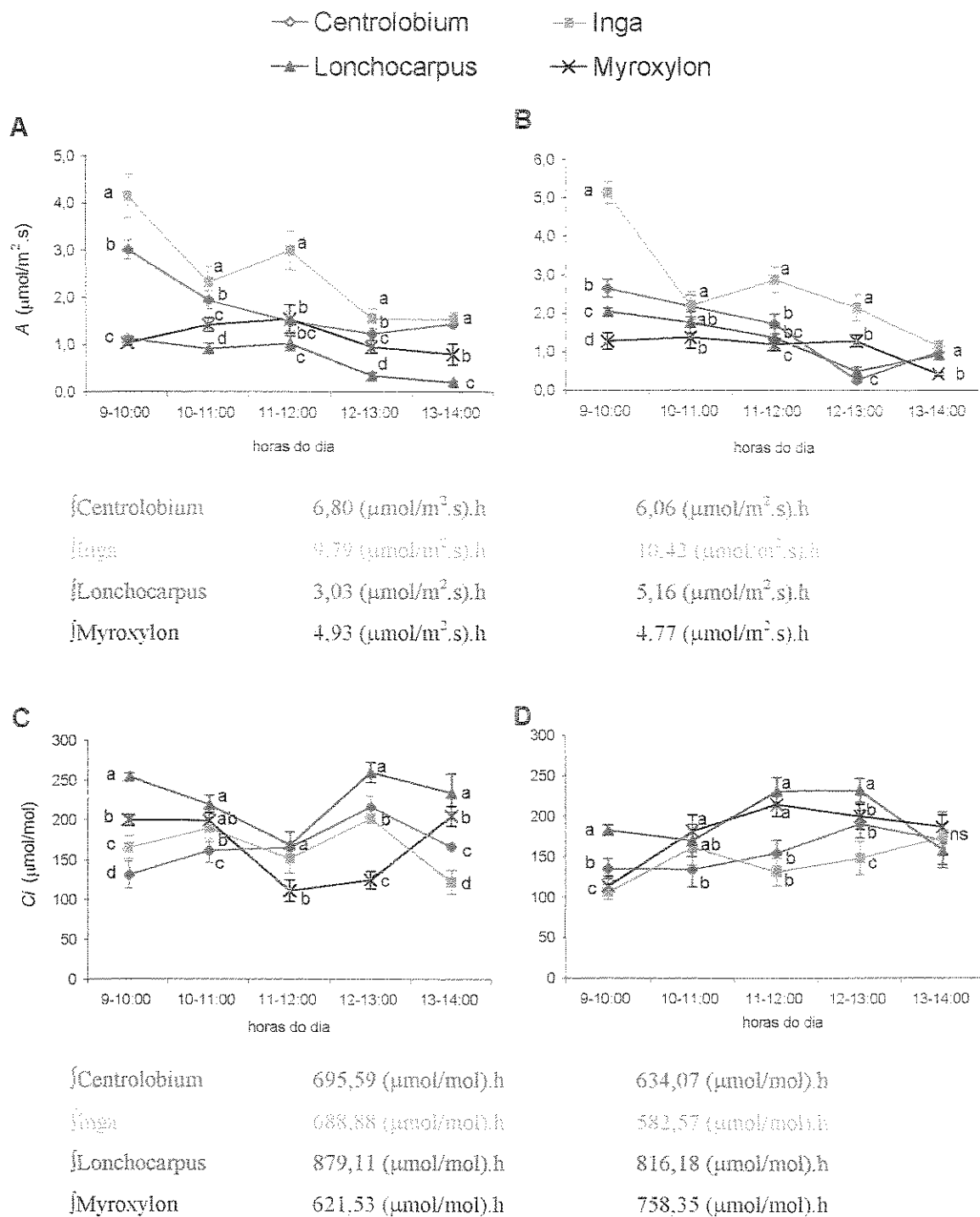


Figura 2.3. Curvas de A e C_i das espécies estudadas, aos 6 meses (A e C) e aos 7 meses (B e D) de idade, com seus respectivos valores integrados. Cada ponto representa a média de 36 medidas (12/planta) realizadas no intervalo de 1 hora. Tukey a 5 % de probabilidade. As letras comparam as diferentes espécies, dentro de cada horário.

para evitar perda da água. Ao diminuir a g_s , a difusão do CO_2 observada pela tendência da C_i variou, aumentando ou diminuindo ao longo do período (fig. 2.3C). Nesta regulação de entrada de CO_2 é possível que o incremento do C_i em certos horários, talvez devido ao aumento da taxa respiratória, tenha provocado o fechando parcial dos estômatos. Segundo Silva & Lemos-Filho (2001), muitas das espécies estudadas por eles apresentaram decréscimos nos valores da g_s nos horários de maior demanda evaporativa do ar. Porém, dentre estas espécies, *Inga edulis* foi a que apresentou maiores valores de g_s e menor restrição da E em dias de maior déficit de vapor de ar, o que também foi visto em *Inga*, no presente estudo.

Em *Inga*, *Lonchocarpus* e *Myroxylon*, observou-se que mesmo com os estômatos ainda parcialmente abertos, a regulação da g_s refletiu-se na tendência da E , pois ao diminuir a g_s , a E também diminuiu. No entanto, em *Centrolobium* a E teve um aumento entre 11:00 h e 12:00h e depois permaneceu estável (fig. 2.2C). Kramer & Boyer (1995) comentaram que a E , como processo contínuo do sistema solo-planta-atmosfera, é controlada pela resposta instantânea do fechamento dos estômatos e que tal controle está diretamente associado ao suprimento de CO_2 à folha e à g_s , mas que deve variar ao longo do tempo, para evitar perdas da água e permitir que a troca de CO_2 continue. Por outro lado, ao transpirarem e realizarem fotossíntese, as plantas restabelecem o C_i , diminuindo as concentrações intracelulares de CO_2 e mantendo um equilíbrio relativo quanto à difusão dos gases através dos estômatos. Porém, o potencial hídrico da folha também determina o fechamento dos estômatos à medida que a disponibilidade de água diminui e o vento pode incrementar a transpiração por perda do vapor da água da camada adjacente à folha.

Em geral, para as quatro espécies estudadas, o aumento ou diminuição da *gs* também foi acompanhado por o aumento ou diminuição da *A*, que ao final do período apresentou valores mínimos (fig. 2.3A).

Estas mesmas tendências foram encontradas em plantas com 7 meses de idade, com algumas diferenças em *Myroxylon*, cuja *gs* incrementou-se até as 13:00 h, aumentando deste modo a *Ci* e a *E*, enquanto a *A* ficou relativamente constante (figs. 2.2B, 2.2D, 2.3B e 2.3D).

No período de 9:00 a 14:00 h, os valores de irradiância no pico de *A* máx. foram observados pela manhã, nas primeiras medições feitas às 9:00 h e oscilaram entre 942 e 1298 $\mu\text{mol f\acute{o}tons/m}^2.\text{s}$, conforme pode ser observado na tabela 2.1.

Tabela 2.1. *A* e *PAR* máximos registrados nas espécies estudadas no período de 9:00 a 14:00h, aos 6 e 7 meses de idade.

Espécie	Centrolobium		Inga		Lonchocarpus		Myroxylon	
Idade (meses)	6	7	6	7	6	7	6	7
<i>A</i> máx ($\mu\text{mol/m}^2.\text{s}$)	3,02	2,66	<u>4,16</u>	<u>5,15</u>	1,13	2,06	1,54	1,37
<i>PAR</i> máx. ($\mu\text{mol f\acute{o}tons/m}^2.\text{s}$)	979	942	1048	984	976	962	<u>1298</u>	<u>1153</u>
EUA ($\mu\text{mol CO}_2/\text{mmol.H}_2\text{O}$)	<u>6,16</u>	<u>4,59</u>	5,01	4,48	2,46	2,86	4,05	2,54

Bustamante *et al.*(1997) citaram que as curvas fotossintéticas de muitas das espécies do Cerrado apresentaram saturação às 8:30 h, com *PAR* que variavam de 300 a 800 $\mu\text{mol/m}^2.\text{s}$. É possível, portanto, que as curvas fotossintéticas das espécies aqui estudadas tenham apresentado saturação logo no início da manhã, em um horário anterior ao início das medições. Mesmo assim, as *PAR* registradas foram semelhantes, em parte, às altas irradiâncias

encontradas por volta das 9:00 h da manhã em trabalhos com outras espécies, que oscilaram entre 600 a 900 $\mu\text{mol f\acute{o}tons/m}^2\text{s}$ (Hall & Rao, 1994; Norman *et al.* 1995; Gonzalez-Rodriguez *et al.*, 2002). Observou-se que em Myroxylon, a *A* máx. apresentou-se a uma irradiância relativamente alta, concordando com as observações feitas por Souza (1996).

Os resultados de *A* máx. das quatro espécies em estudo foram, no geral, relativamente baixos quando comparados com os de outras espécies. No entanto, segundo Norman *et al.* (1995) as plantas C3 têm baixa *A* por unidade de área foliar e algumas leguminosas arbóreas apresentam baixa atividade fotossintética devido à sua baixa condutância mesofílica. Mas Richard & Teeri (1984) observaram taxas fotossintéticas bem altas em *Camissonia claviformis*, que, sendo C3, apresentou *A* máx. de 59 $\mu\text{mol/m}^2\text{s}$ e Hatch (1976) encontrou *A* de 54 $\mu\text{mol/m}^2\text{s}$ em *Medicago sativa*. Estas taxas fotossintéticas bem podem ser comparadas às apresentadas por plantas C4, como as de *Atriplex nummularia* e *A. halimus* que foram 53 $\mu\text{mol/m}^2\text{s}$ e 34,7 $\mu\text{mol/m}^2\text{s}$, respectivamente (Pham Thi *et al.*, 1982). Prado *et al.* (1994) observaram em *Copaifera langsdorffii* do Cerrado, *A* de 8,5 $\mu\text{mol/m}^2\text{s}$ e Tan *et al.* (1994) verificaram em diversas espécies arbustivas pioneiras, *A* variando de 9,43 $\mu\text{mol/m}^2\text{s}$ a 49 $\mu\text{mol f\acute{o}tons/m}^2\text{s}$. Souza (1996), que trabalhou com espécies mantidas em casa de vegetação na Universidade Estadual de Campinas, SP, comentou que a *A* máx. encontrada para Myroxylon foi de 3,60 $\mu\text{mol/m}^2\text{s}$ a uma irradiância de 991 $\mu\text{mol f\acute{o}tons/m}^2\text{s}$ e que, para outras espécies estudadas, *A* variou de 1,30 $\mu\text{mol/m}^2\text{s}$ a 867 $\mu\text{mol f\acute{o}tons/m}^2\text{s}$ para *Hymenaea courbaril* a 6,44 $\mu\text{mol/m}^2\text{s}$ a 1340 $\mu\text{mol f\acute{o}tons/m}^2\text{s}$ para *Cecropia glauzioui*. Bustamante *et al.* (1997) registraram altas *A* no início da manhã (de 8:30 a 10:30 h) em espécies de Cerrado ao sul de Brasília, como por exemplo, *Qualea parvifolia* com *A* de 15 $\mu\text{mol/m}^2\text{s}$ e *Dalbergia miscolobium* com *A* de 35 $\mu\text{mol/m}^2\text{s}$. Ao meio-dia estas espécies tiveram sua *A* reduzida para

2,5 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$. González-Rodríguez *et al.* (2002) comentaram que *Persea indica*, considerada climática em uma floresta de Tenerife (Ilhas Canarias), apresentou grande plasticidade, com A variando de 11 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ a 750 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$. Todas as diferenças citadas, em termos de capacidade fotossintética, são reflexos das diferentes condições ambientais em que as plantas cresceram, além da pré-determinação genética destas espécies.

Quanto à EUA, Nobel (1991) comentou que, em geral, as plantas C3 possuem EUA que varia de 1 a 3 μmol de CO_2 fixado/ mmol de H_2O transpirada. Nas espécies estudadas, como pode ser visto na tabela 2.1, os valores de EUA foram maiores que os observados por vários outros autores para espécies arbóreas. González-Rodríguez *et al.* (2002), mencionaram para *Persea indica* EUA de 1,5 $\mu\text{mol}/\text{mmol}$, o que é considerado baixo e Souza *et al.* (2001) registraram EUA em *Vitis labrusca* de 3,5 $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ em casa de vegetação. Segundo os dados de A e E obtidos por Souza (1996), pode-se inferir que a EUA em *Chorisia speciosa* foi de 1,74 $\mu\text{mol}/\text{mmol}$; em *Myroxylon peruiferum* de 1,55 $\mu\text{mol}/\text{mmol}$; em *Schizolobium parahyba* de 1,32 $\mu\text{mol}/\text{mmol}$; em *Hymenaea courbaril* de 1,29 $\mu\text{mol}/\text{mmol}$; em *Esenbeckia leiocarpa* de 0,74 $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ e em *Cecropia glaziovii* foi de 0,53 $\mu\text{mol}/\text{mmol}$. Schulze & Hall (1982) comentaram que a importância ecológica que as plantas obtêm ao variar proporcionalmente A e g_s em uma relação linear, é conseguir manter a C_i e a EUA constantes, otimizando assim as trocas gasosas. Mas, mesmo que A e g_s variem proporcionalmente em uma relação linear, a EUA pode diminuir com o decréscimo da g_s provocando a redução na eficiência fotossintética. Rocha & Moraes (1997, citado por Oliveira *et al.*, 2001) observaram em espécies de *Stryphondendron adstringens*, que o aumento na EUA ocorreu quando a g_s e a E foram menores, o que seria uma adaptação à deficiência hídrica.

Quanto ao conteúdo de pigmentos extraídos com DMSO, aos sete meses de idade, observou-se que as folhas de *Myroxylon* apresentaram maior conteúdo de clor. a e b por

unidade de massa que as folhas das outras espécies. *Centrolobium* e *Lonchocarpus* apresentaram maiores teores de carotenóides que *Myroxylon* e *Inga*. No entanto, ao se considerar teor de pigmentos por unidade de área, *Centrolobium* apresentou maior conteúdo de clor. *a* e *b* que as outras espécies, as quais não apresentaram diferenças entre si. *Myroxylon*, *Lonchocarpus* e *Centrolobium* apresentaram os mesmos teores de carotenóides por unidade de área foliar. Quanto à razão *a/b*, o maior valor foi apresentado por *Centrolobium*, seguido de *Inga*, *Myroxylon* e *Lonchocarpus*, que apresentaram razões estatisticamente iguais (tabela 2.2).

Tabela 2.2. Teores de clor. *a*, *b* e total, carotenóides, razão *a/b* das espécies estudadas, aos 7 meses de idade. Extração com DMSO. As letras minúsculas e maiúsculas comparam os valores por unidade de massa foliar ou por unidade de área foliar, respectivamente. Tukey a 5% de probabilidade.

Espécies	Centrolobium		Inga		Lonchocarpus		Myroxylon	
Pigmentos	mg/gMS	mg/cm ²	mg/gMS	mg/cm ²	mg/gMS	mg/cm ²	mg/gMS	mg/cm ²
Clor. <i>a</i>	3,65 b (± 0,24)	0,07 A (± 0,03)	3,68 b (± 0,05)	0,03 B (± 0,00)	3,20 c (± 0,46)	0,02 B (± 0,00)	<u>4,07</u> a (± 0,12)	0,02 B (± 0,00)
Clor. <i>b</i>	1,06 c (± 0,13)	0,02 A (± 0,01)	1,56 b (± 0,13)	0,01 B (± 0,00)	1,49 b (± 0,16)	0,01 B (± 0,00)	<u>1,82</u> a (± 0,06)	0,01 B (± 0,00)
Clor. total	4,71 c (± 0,37)	0,09 A (± 0,04)	5,24 b (± 0,15)	0,04 B (± 0,00)	4,69 c (± 0,61)	0,03 B (± 0,00)	<u>5,88</u> a (± 0,17)	0,04 B (± 0,00)
Carotenóides	<u>3,04</u> a (± 0,18)	0,09 A (± 0,04)	2,59 b (± 0,03)	0,02 B (± 0,00)	<u>3,00</u> a (± 0,07)	0,09 A (± 0,00)	2,71 b (± 0,09)	0,09 A (± 0,00)
Razão Clor. <i>a</i> /Clor. <i>b</i>	<u>3,44</u> a (± 0,23)	3,50 A (± 0,23)	2,36 b (± 0,19)	2,50 B (± 0,19)	2,15 c (± 0,09)	2,50 B (± 0,09)	2,24 bc (± 0,01)	1,82 C (± 0,01)

Em geral, os valores de clor. *a* e *b* nas espécies estudadas foram menores quando comparados aos de outras espécies. Souza (1996) encontrou em *Myroxylon* valores de clor. *a*, *b*, total e razão *a/b* um pouco maiores que os obtidos neste trabalho quando os cálculos foram realizados em mg/g MS. Quando o conteúdo de pigmentos foi calculado em mg/cm² de folha, os valores obtidos nos dois casos foram praticamente iguais. Lichtenthaler (1987) mencionou que as modificações da razão clor *a/b* dependem das condições de crescimento e da intensidade luminosa em que as plantas ficaram expostas. O mesmo autor comentou que, quando as plantas são submetidas a elevadas intensidades luminosas, a razão *a/b* pode oscilar entre 3,2–4,0, enquanto que, em baixas intensidades, esta razão oscila entre 2,0–2,5. Nas condições de casa de vegetação onde as plantas em estudo cresceram, a intensidade luminosa foi limitada pelos vidros do teto da casa de vegetação, mas mesmo assim, *Centrolobium* apresentou razão acima de 3,2, característica de locais de altas intensidades luminosas. Isto possivelmente tem a ver com a maior dimensão do aparelho fotossintético representado pela RAF (dm²/g) e AFE (dm²/g) de *Centrolobium* (vide figs. 1.4C e 1.4D, capítulo 1), que é uma espécie considerada intolerante à sombra (Aidar, 1992; Sanches, 1997).

Expressando-se os dados de *A* em função da quantidade de clor. total por unidade de área foliar (m²), observou-se que *Centrolobium* apresentou o maior valor, com 23,9 µmol CO₂.g de clor. total/s, seguido por *Inga* com 20,6 µmol CO₂.g de clor. total/s, *Lonchocarpus* 6,2 µmol CO₂.g de clor. total/s e *Myroxylon* com 5,5 µmol CO₂.g de clor. total/s. Pimentel (1998) mencionou que a atividade fotossintética está relacionada ao número de cloroplastos dispostos tanto horizontalmente, no caso de maior área foliar, quanto verticalmente, quando há maior espessura e área específica. Uma folha mais espessa e mais curta vai manter alta atividade fotossintética por unidade de área, com menor superfície de transpiração. Evans (1989) comentou que, ao comparar diferentes espécies arbóreas, verificou que as pioneiras, de

crescimento rápido, possuem maior A que espécies climácicas, de crescimento lento. Mas esta observação é relativa, pois depende dos fatores ambientais de crescimento em que as plantas estiveram submetidas, já que o incremento na MS só ocorre quando a irradiância encontra-se acima do ponto de compensação luminosa, que é a irradiância à qual a fotossíntese está em equilíbrio com a respiração e a troca líquida de CO_2 é zero.

V. CAPÍTULO 3

ATIVIDADE ENZIMÁTICA E METABÓLITOS RELACIONADOS À ASSIMILAÇÃO DO NITROGÊNIO EM QUATRO ESPÉCIES DE LEGUMINOSAS ARBÓREAS TROPICAIS

1. INTRODUÇÃO

Pimentel (1998) comentou que o N está pouco disponível em solos tropicais por ser um elemento que é lixiviado, volatilizado e utilizado por microrganismos, cuja atividade biológica é maior neste ambiente que nos solos de regiões temperadas, devido às altas temperaturas e precipitações. Além disso, o N atmosférico, que compreende 78 % do ar, não reage quimicamente em condições normais; por estas razões, as plantas têm desenvolvido mecanismos para maximizar a absorção, assimilação e mobilização do N para evitar o seu desperdício, resultando em adaptações às condições ambientais de baixo suprimento de N (Bustamante *et al.*, 1997). Um destes mecanismos é a redução do N atmosférico a amônia pelo processo da fixação biológica de nitrogênio (FBN), catalisada pelo complexo enzimático nitrogenase existente em microorganismos que podem formar associações simbióticas com leguminosas e não leguminosas (Taiz & Zeiger, 1998).

Segundo Bustamante *et al.* (1997), a competição entre plantas e a dinâmica populacional são reguladas pelas diferenças específicas entre as quantidades mínimas de recursos necessários à sobrevivência em determinado habitat. Assim, diferenças na eficiência de assimilação de N podem estar determinando a distribuição das espécies e isto poderia ser um fator limitante para o estabelecimento das plantas nos trópicos (Faria & Lima, 1998).

Mesmo que as leguminosas nem sempre possuam altos I.V.I., e nem todas as espécies tenham a capacidade de fixar N, este elemento mineral é essencial ao crescimento das plantas (Elevitch & Wilkinson, 1998-99).

Sprent (2000) mencionou que, do total das espécies de leguminosas que foram estudadas com relação à presença de nodulação cerca de 3% ainda necessitam de confirmação. Segundo Faria & Lima (1998), até agora só 40% das espécies de leguminosas foram estudadas. Existe uma grande quantidade de leguminosas arbóreas capazes de nodular, mas algumas destas espécies só nodulam quando são induzidas em condições de laboratório ou em latitudes diferentes às de condições brasileiras (Magalhães *et al.*, 1982; Faria *et al.*, 1987; Faria *et al.*, 1989; Moreira *et al.*, 1992; Faria & Lima, 1998; Roggy & Prévost, 1999).

As espécies fixadoras de N₂ são a maior fonte de N nos ecossistemas tropicais e a energia necessária à FBN provém da fotossíntese pela transferência da sacarose, via floema, das folhas até os nódulos (Azcon-Bieto & Talon, 1993). O processo da FBN é catalisado pelo complexo enzimático nitrogenase de algumas bactérias aeróbias da família *Rhizobiaceae*, chamadas genericamente de rizóbios, que quebra a tripla ligação entre os dois átomos de N₂ e o reduz a amônio (NH₄⁺), que é uma forma utilizável pelas plantas. Este processo ocorre nos nódulos, que são estruturas altamente especializadas formadas após o estabelecimento da simbiose entre o microssimbionte e a planta hospedeira (Sprent, 2001). Nesta associação, a planta, em troca do N assimilado, fornece para os nódulos o ATP necessário para a redução de N₂ a NH₄⁺ e esqueletos de carbono, para a formação de compostos orgânicos nitrogenados (Dixon & Wheeler, 1986).

Nos estádios iniciais de infecção e formação dos nódulos, são produzidas as enzimas responsáveis pela redução e assimilação do N₂ atmosférico. O ATP também é essencial para a fixação do N₂, pois este se une à ferropoteína (Fe-proteína, dinitrogenase redutase,

componente II), que é uma das duas proteínas que compõe a nitrogenase (Azcon-Bieto & Talon, 1993).

O NH_4^+ é o primeiro produto estável no processo de fixação biológica do N_2 . Ele é transferido das células que contêm as bactérias, através da membrana peribacteroidal, para o citosol das células do periciclo adjacente aos feixes vasculares próximos ao nódulo, onde é posteriormente assimilado e usado na síntese de compostos nitrogenados que serão transportados pelo xilema da raiz e do caule, junto à corrente transpiratória, à parte aérea da planta hospedeira (Tajima *et al.*, 2000).

O NH_4^+ , tenha sido absorvido diretamente do solo, formado pela redução do NO_3^- ou pela fixação de nitrogênio, deve ser incorporado rapidamente em aminoácidos, amidas e proteínas, para evitar sua acumulação em concentrações que possam inibir a síntese da nitrogenase ou a formação de ATP nos cloroplastos e mitocôndrias, agindo como agente desacoplante e causando dano celular (Bergersen & Turner, 1967, Hungria & Araújo, 1994). Por esta razão, o NH_4^+ primeiro converte-se no grupo amida da glutamina e esta conversão, junto com outras, dá como resultado ácido glutâmico, ácido aspártico e asparagina. A glutamina se forma pela adição de um grupo NH_2 , proveniente do NH_4^+ , ao grupo carboxílico mais afastado do carbono alfa do ácido glutâmico, formando uma amida por uma reação catalisada pela Glutamina Sintetase (GS). Devido ao fato desta reação precisar de ácido glutâmico como reagente, a Glutamato Sintase (GOGAT-NADH e GOGAT-dependente de ferredoxina) transfere o grupo amida da glutamina para o carbono carbonílico do ácido α -cetoglutárico e formam-se duas moléculas de ácido glutâmico. Este processo requer um agente redutor capaz de doar dois elétrons, que pode ser a ferredoxina nos cloroplastos ou o NADH ou o NADPH nos protoplastídios das células não fotossintéticas (Azcon-Bieto & Talon, 1993).

Um dos dois glutamatos formados pela GOGAT pode ser destinado a manter a reação da GS, enquanto que o outro pode participar de outros processos na planta, como biossíntese de proteínas, clorofilas, ácidos nucleicos, etc. Além de formar glutamato, a glutamina pode doar seu grupo amida ao ácido aspártico para formar asparagina, na reação catalisada pela Asparagina Sintetase. Nas folhas maduras, a glutamina se forma a partir do ácido glutâmico e do NH_4^+ que é produzido pela degradação de proteínas, sendo depois transportada pelo floema às folhas mais jovens, raízes, flores, sementes ou frutos, onde o nitrogênio é reutilizado. A glutamina pode incorporar-se diretamente às proteínas de todas as células como um dos 20 aminoácidos (Boland *et al.*, 1982; Hungria & Araújo, 1994).

Para as plantas que não fixam N_2 , as únicas fontes de nitrogênio são o NO_3^- e o NH_4^+ do solo. No entanto, muitas espécies nativas absorvem preferencialmente o nitrogênio na forma de NO_3^- por ser o NH_4^+ oxidado a NO_3^- com muita rapidez pelas bactérias nitrificantes do solo. Para reduzir NO_3^- a NH_4^+ , é necessária a energia de 8 elétrons e 10 H^+ , para mudar o número de oxidação do nitrogênio de +5 para -3. Esta redução efetua-se em duas reações, sendo que na primeira delas, catalisada pela Redutase do Nitrato (RN), são transferidos dois elétrons procedentes do NADH, resultando nos produtos nitrito (NO_2^-), NAD^+ e H_2O . Esta reação se realiza no citosol. A RN, que é induzida pela luz e pelas altas concentrações de NO_3^- no citosol, controla a velocidade da síntese de proteínas nas plantas que absorvem NO_3^- como fonte principal de nitrogênio. Ao que parece, a RN é degradada e sintetizada continuamente devido à atividade de proteinases que regulam a quantidade de RN nas células. Quando a luz ativa os fotossistemas, há um aumento do transporte de NO_3^- armazenado do vacúolo para o citosol, onde se efetua a indução da RN (Granstedt & Huffaker, 1982). A segunda reação implica na conversão de nitrito à NH_4^+ . O nitrito originado no citosol pela RN é transportado

aos cloroplastos nas folhas ou aos protoplastídeos nas raízes, onde é realizada a redução a NH_4^+ , em reação catalisada pela Redutase de Nitrito. Nas folhas, a redução de NO_2^- a NH_4^+ requer 6 elétrons que são obtidos da H_2O , mediante o transporte acíclico de elétrons no cloroplasto induzido pela luz. Pela transferência de elétrons, forma-se ferredoxina reduzida, que fornece então os 6 elétrons requeridos para a reação (Granstedt & Huffaker, 1982).

O N fixado nos nódulos pode ser transportado para outras partes da planta na forma de URE (alantoina e ácido alantóico) ou na forma de amidas (Atkins *et al.*, 1980; Hungria *et al.*, 1991, Hungria e Araújo, 1994). A análise dos compostos nitrogenados na seiva do xilema mostra as variações metabólicas que ocorrem entre as espécies, as quais são características do microssimbionte e do hospedeiro. Tal análise pode mostrar também alterações metabólicas causadas por estresses de algum tipo (Hungria & Araújo, 1994).

Em geral, os fatores que favorecem a fotossíntese, como valores adequados de umidade, temperatura, luz solar, concentração de CO_2 , estimulam a fixação de nitrogênio (Salisbury & Ross, 1994) e, como consequência, a taxa de fixação de nitrogênio é máxima ao meio dia, quando a translocação de açúcares das folhas aos nódulos é mais rápida. Nas horas que precedem o pôr do sol, a respiração se realiza com maior rapidez e a corrente de transpiração ajuda a exportar os compostos nitrogenados das raízes e nódulos radiculares (Pate, 1980).

Nas plantas, existe correlação entre o metabolismo de N e C, ocorrendo aumento da atividade fotossintética com o aumento gradual do conteúdo de N na ontogenia da folha e declínio da atividade fotossintética com a diminuição da disponibilidade de N. Isto porque, sendo a assimilação do C dependente da atividade da Rubisco, enzima que equivale a mais de 50% do N foliar, a assimilação de CO_2 é diretamente proporcional ao conteúdo de N foliar. Assim sendo, que com o aumento da disponibilidade de N, há um aumento proporcional da

atividade da Rubisco e da assimilação de C. Além disso, o N é imprescindível para a formação das membranas dos tilacóides e pigmentos do cloroplasto (Pimentel, 1998).

Oliveira *et al.* (2001) enfatizaram que a expressão gênica do funcionamento, regulação e transcrição das enzimas envolvidas na assimilação do N são reguladas pela luz e pela disponibilidade de nutrientes. Segundo os autores, a luz permite coordenar a assimilação do N inorgânico com a disponibilidade de blocos de C produzidos durante a fotossíntese, sustentando desta maneira o balanço do crescimento e desenvolvimento na produtividade vegetal.

Os objetivos específicos deste capítulo foram determinar a atividade específica de algumas enzimas responsáveis pela assimilação do N, relacionar esta atividade com alguns metabólitos produzidos na assimilação do N e correlacionar as variáveis de crescimento e de produtividade primária com a assimilação do N.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material vegetal e condições de cultivo

Foram utilizadas plantas com 7, 9 e 10 meses de idade de *Centrolobium tomentosum* Mart. ex Benth.(*Centrolobium*), cultivadas a partir de sementes coletadas na Reserva Municipal de Santa Genebra, Campinas, SP.; *Inga vera* Willd. (*Inga*), *Lonchocarpus muehlbergianus* Hassl. (*Lonchocarpus*) e *Myroxylon peruiferum* L.f. (*Myroxylon*), cultivadas a partir de sementes coletadas na Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, SP. Estas espécies foram mantidas em vasos de 5 L, contendo solo proveniente da Reserva Municipal de Santa Genebra, Campinas, SP, sob condições naturais de luz e temperatura, em casa de vegetação do Instituto de Biologia, UNICAMP. Todas as espécies, exceto *Myroxylon* que não apresenta nódulos radiculares, foram previamente inoculadas com rizóbios nativos provenientes do solo da Reserva de Santa Genebra.

2.2. Enzimas relacionadas com a assimilação do nitrogênio

2.2.1. Atividade da nitrogenase (ARA)

Utilizou-se o método da atividade da redução do acetileno - ARA (Hardy *et al.*, 1968), usando-se plantas intactas de 7 e 10 meses de idade, segundo Gomes & Sodek (1987), para avaliar a eficiência da nitrogenase (N_2 ase - E.C. 1.18.6.1) nas espécies que apresentaram nódulos radiculares (*Centrolobium*, *Inga* e *Lonchocarpus*).

Foram utilizadas 9 plantas de cada espécie para cada idade. Cada um destes vasos foi colocado dentro de um saco plástico que foi selado hermeticamente ao redor do caule. Previamente foi ajustada uma rolha de borracha ao saco plástico para possibilitar a substituição de 10 % da atmosfera do vaso por acetileno puro (WHITE MARTINS) e posterior retirada de amostras do gás produzido.

Após 0, 20, 40, 60 e 80 minutos de incubação a condições normais, foram retiradas amostras de 50 μ L do gás da atmosfera do vaso para dosar a quantidade de etileno produzido. Estas amostras foram injetadas em um cromatógrafo a gás (GC-14B, SHIMADZU), equipado com detector de ionização de chama e coluna de aço inoxidável de 6' x 1/4", com a fase sólida constituída de Hayesep T com malha de 80/100, para separar etileno e acetileno. O gás de arraste utilizado foi nitrogênio puro (N_2) (WHITE MARTINS) a um fluxo de 20 mL/min. A temperatura da coluna foi de 80 °C, do injetor de 100 °C e do detector de 150 °C. Os picos e tempos de retenção das amostras injetadas foram registrados em Registrador (C-R6A Chromatopac. SHIMADZU) conectado ao cromatógrafo. Os padrões utilizados foram etileno 1,024 μ moles (50 ppm) e acetileno 10,24 μ moles (500 ppm), ambos da WHITE MARTINS. As avaliações quantitativas do etileno liberado no interior dos vasos foram feitas a partir da comparação com o padrão de etileno e os dados foram convertidos em μ moles de etileno liberado/g nódulos.h.

Depois de terminado o ensaio, os vasos foram retirados dos sacos plásticos e o sistema radicular foi cuidadosamente lavado. Os nódulos radiculares foram removidos e sua MF foi determinada em balança analítica (MARTE).

2.2.2. Atividade da redutase do nitrato (RN)

Três grupos de três vasos de cada uma das quatro espécies aos 8 meses de idade (total de 9 plantas/espécie), foram tratados da seguinte maneira: no primeiro grupo, a irrigação foi feita com água da torneira; no segundo grupo, as plantas foram irrigadas com solução nutritiva de Hoagland & Arnon (1938) sem fonte de nitrogênio (-N); no terceiro grupo, as plantas foram irrigadas com solução nutritiva completa, contendo NO_3^- 15 mM como fonte de nitrogênio (solução +N). Diariamente foram fornecidos 100 mL de solução durante o período de um mês.

A atividade da RN (E.C. 1.6.6.1.) foi estimada "*in vivo*", segundo o método de Hageman & Hucklesby (1971), que consiste na infiltração do tecido com uma solução contendo nitrato e na posterior dosagem do nitrito produzido na reação e difundido para o meio de incubação. Discos foliares e cortes apicais radiculares (cerca de 300 mg de MF) foram colocados em tubos de vidro escuros contendo 10 mL do meio de infiltração (tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,8 e n-propanol a 1%). Para verificar e induzir a atividade da RN, os meios de infiltração foram divididos em tubos com adição de nitrato de potássio (KNO_3) (atividade potencial) e sem adição de nitrato de potássio (atividade real).

Os tecidos vegetais foram mantidos submersos nos meios de infiltração e colocados sob vácuo (aproximadamente 5 Kg/cm^2 de pressão) durante dois minutos (Bombas de vácuo e Compressores Rotativos, Modelo 141, Tipo 2VC, PRIMAR LTDA). O ar foi rapidamente re-introduzido e este procedimento foi repetido por mais duas vezes. Após este tratamento, os tubos foram incubados em banho-maria (FANEM) a 32 °C sob agitação. Durante a reação, os tubos foram mantidos no escuro para evitar que a enzima redutase de nitrito utilizasse o nitrito formado na reação catalisada.

Nos intervalos de tempo de 0, 20, 40, 60 e 90 minutos após incubação, foram removidas alíquotas de 0,2 mL do meio de infiltração, as quais foram colocadas em tubos contendo 1,8 mL de água destilada e 1,0 mL de sulfanilamida a 1% em ácido clorídrico 1,5 N (m/v). Imediatamente, foi adicionado 1,0 mL de N-naftil-etileno-diamino a 0,02% (m/v), para a determinação colorimétrica do nitrito. Os tubos foram agitados (agitador de tubos VELP Scientifica) e deixados em repouso por 15 minutos para desenvolvimento da cor. As leituras de densidade óptica foram realizadas em espectrofotômetro (Pharmacia Biotech., Ultrospec 1000) a 540 nm. A quantidade de nitrito foi calculada utilizando-se uma reta padrão de nitrito de potássio na faixa de concentração de 0 a 300 µg de NO₂⁻.

A atividade enzimática foi expressa em µmol de nitrito produzido/mg MF foliar ou radicular.h.

2.2.3. Atividade da glutamina sintetase (GS)

Para poder comparar as atividades da Glutamina Sintetase (G.S. - E.C. 6.3.1.2.) em diferentes partes das plantas com 8 meses de idade, trabalhou-se com o ensaio semi-biossintético baseado na metodologia de Cullimore *et al.* (1982) e utilizado por Hungria *et al.* (1991).

A estimativa da atividade da GS em folhas, raízes e nódulos das quatro espécies foi feita em triplicata medindo-se a formação de GHA, segundo Ferguson & Sims (1971), a partir dos substratos GLU e hidroxilamina, este último utilizado como substituto da amônia.

A enzima foi extraída macerando-se os tecidos em almofariz (1,5 g de tecido fresco) em 4,0 mL de tampão de extração com a seguinte composição: imidazol-HCl 50 mM, pH 7,2, 10% (v/v) de glicerol, DTT 5 mM, EDTA 5 mM, triton X-100 a 0,05% (v/v) e PVP a 0,01%

(m/v) (Hungria *et al.*, 1991). O homogeneizado foi filtrado em gaze previamente umedecida com tampão de extração e centrifugado a 20.000 xg por 30 minutos a 4 °C (BECKMAN, J2-21). O sobrenadante foi coletado e passado por coluna de Sephadex G-25 (Sephadex G-25M, Amersham, Pharmacia Biotech) previamente equilibrada com tampão de extração sem triton X-100. O volume da fração protéica foi coletado, medido e imediatamente utilizado para as avaliações da atividade enzimática. Todos estes procedimentos foram realizados com materiais resfriados mantidos em banho de gelo.

O ensaio para determinar a atividade da GS foi realizado segundo Rhodes *et al.* (1975), modificando-se o volume da alíquota do extrato dessalinizado para 500 µL e acrescentando-a a uma solução constituída por GLU 90 mM, hidroxilamina-HCl 6 mM, cloreto de magnésio 54 mM, ATP 6 mM e tampão imidazol-HCl, pH 7,2 64 mM, obtendo-se um volume final de 2500 µL. O meio de reação foi incubado a 30 °C em banho-maria (FANEM) e, em intervalos de 0, 10, 20, 30 e 40 minutos, foram retiradas alíquotas de 500 µL. A reação foi paralisada com 600 µL do reagente de Ferguson & Sims (1971) constituído por HCl 0,67 N, e ácido tricloroacético (TCA) 0,2 M e cloreto férrico 0,37 M. As proteínas precipitadas foram removidas por microcentrifugação a 14.000 xg (Centrifuge 5415, C. Brinkmann Instruments. Inc.) por 5 minutos e a absorbância no sobrenadante foi medida em espectrofotômetro (Pharmacia Biotech., Ultrospec 1000) a 535 nm. O branco foi constituído da mistura acima sem ATP.

A concentração do produto foi determinada pelo coeficiente de extinção do GHA. Segundo Mori (1981) um µmol de GHA corresponde a uma absorbância de 0,34.

Para expressar a atividade enzimática em nmol de GHA formado/mg de prot.h., foi analisado, em separado, o teor protéico dos extratos, utilizando-se o método de Bradford (1976).

2.2.4. Atividade da glutamato sintase (GOGAT-NADH)

A atividade da Glutamina Sintase dependente de NADH (GOGAT-NADH - E.C. 1.4.1.14) foi avaliada pelo método proposto por Hungria *et al.* (1991), o qual quantifica o NADH oxidado durante a reação, na presença dos substratos GLU e ácido cetoglutárico.

Para a estimativa da atividade da GOGAT-NADH em folhas, raízes e nódulos nas plantas das quatro espécies com 8 meses de idade, foi feita em triplicata, a maceração dos tecidos frescos em almofariz, em tampão de extração contendo Tris-HCL 50 mM, pH 7,5, DTT 10 mM, EDTA 1 mM, PVP a 0,01% (m/v), mercaptoetanol a 1% (m/v) e triton X-100 a 0,05% (v/v). Foram utilizados 1,5 g de tecido, 5,0 mL de tampão de extração e 150 mg de PVPP insolúvel. O homogeneizado foi filtrado em gaze previamente umedecida com tampão de extração e centrifugado a 11.600 xg por 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi coletado e passado por coluna de Sephadex G-25, previamente equilibrada com tampão de extração sem triton X-100. Todos estes procedimentos foram realizados com materiais resfriados mantidos em banho de gelo.

O ensaio para determinar a atividade da GOGAT-NADH foi realizado acrescentando-se uma alíquota de 125 µL do extrato dessalinizado à solução constituída por GLU 5 mM, NADH 0,1 mM, ácido cetoglutárico 10 mM e tampão TRIS/HCl 32,2 mM, pH 7,5, obtendo-se um volume final de 2500 µL. O meio de reação foi incubado a 30 °C em banho-maria (FANEM) e, em intervalos de 0, 15, 30, 45 e 60 minutos, as cubetas foram retiradas e as absorbâncias lidas em espectrofotômetro (Pharmacia Biotech., Ultrospec 1000) a 340 nm.

Os brancos utilizados foram constituídos pela mistura acima, sem GLU para um branco e sem ácido cetoglutárico para o outro. O espectrofotômetro foi zerado com água destilada e as

absorbâncias líquidas das amostras foram calculadas subtraindo-se os valores das médias dos respectivos brancos.

A atividade da enzima foi avaliada calculando-se a taxa de oxidação do NADH. Segundo Dougal (1974), um μmol de NADH corresponde a uma absorbância de 0,622.

Para expressar a atividade enzimática em μmol de NADH oxidado/mg de prot.h, foi analisado, em separado, o teor protéico dos extratos, utilizando-se o método de Bradford (1976).

2.3. Metabólitos relacionados com a assimilação do nitrogênio

Para a extração dos metabólitos, foi utilizado aproximadamente 1,6 g de tecido vegetal fresco (folhas, raízes e nódulos) em triplicata, das plantas das quatro espécies em estudo, aos 10 meses de idade.

O material vegetal foi macerado em almofariz com N_2 líquido e homogeneizado com 20 mL de uma solução composta por metanol, clorofórmio e água (MCW), na proporção de 12:5:3 (v/v/v), segundo Bielecki & Turner (1966). O material foi deixado em tubos de polipropileno por 36 h e posteriormente centrifugado a 2.500 xg (FANEM) por 30 minutos. O sobrenadante foi recuperado e para cada 4 mL do extrato, foram acrescentados 1,0 mL de clorofórmio e 1,5 mL de água. Os tubos foram agitados vigorosamente e deixados em repouso por 24 h para que ocorresse a separação da fase aquosa superior da fase inferior do clorofórmio, que foi retirada com uma pipeta Pasteur e descartada. A fase aquosa foi mantida em banho-maria a 38 °C por cerca de 20 h, para a eliminação dos resíduos do clorofórmio e para a concentração das amostras. Estas foram centrifugadas a 10.000 xg por 5 min. Os volumes dos extratos foram medidos e estes foram mantidos em freezer para posterior

utilização nas análises. Na fase aquosa dos extratos, foram determinados ALT, N-NO_3^- e N-NH_4^+ .

Foram realizadas análises de ALT, N-NO_3^- e N-NH_4^+ e URE total na seiva das quatro espécies. Para a coleta da seiva, os caules das espécies foram cuidadosamente seccionados na altura do primeiro nó nodular e a parte radicular foi introduzida em uma câmara de pressão (PMS Instrument Co 1000) conectada a um cilindro de nitrogênio. Gás sob pressão foi injetado até a saída da seiva (8-12 mbar). A seiva foi coletada com capilar até que fosse obtido o volume de aproximadamente 1000 μL e mantida em eppendorf resfriado em banho de gelo. Este material foi conservado em freezer até sua utilização.

2.3.1. Análise de aminoácidos livres totais (ALT)

Os ALT foram determinados, em triplicata, segundo o método de Yemm & Cocking (1955), por reação colorimétrica de ninhidrina com os grupos α -amino livres dos aminoácidos e peptídeos (Lehninger, 1976). Foram tomados 50 μL da fase aquosa dos extratos ou da seiva do xilema e completados até 1000 μL com água destilada, acrescentando-se a seguir 500 μL de tampão citrato (composto por ácido cítrico e citrato de sódio) 0,2 M, pH 5,0, 200 μL do reativo de ninhidrina diluído em metilcelusolve a 5% (m/v) e 1000 μL de cianeto de potássio 0,0002 M diluído em metilcelusolve a 5%. Os tubos foram agitados, cobertos com bolinhas de gude e mantidos em banho-maria a 100 °C por 20 min. Após este período, foram colocados no escuro, onde permaneceram até atingir a temperatura ambiente. Depois disto, foram acrescentados 1,3 mL de etanol a 60% (v/v) a cada tubo. Estes foram agitados e a absorbância medida em espectrofotômetro (FEMTO, 435) a 570 nm.

Foi feita uma curva padrão com L-Leucina, com concentrações de 5 a 50 nmol/mL.

2.3.2. Análise de N-Nitrato (N-NO_3^-)

A determinação de N-NO_3^- foi executada em triplicata, pelo método de Cataldo *et al.* (1975). Em tubos contendo 50 μL de extrato ou seiva, foram adicionados 200 μL do reagente salicílico resfriado a 5% (m/v) em H_2SO_4 concentrado. Os tubos foram agitados manualmente e, após 20 min de espera em temperatura ambiente, foram adicionados 4,75 mL de NaOH 2 N. Após resfriamento dos tubos à temperatura ambiente, estes foram novamente agitados e as absorvâncias medidas em espectrofotômetro (FEMTO, 435) a 410 nm.

Foi feita uma curva padrão com nitrato de potássio nas concentrações de 50 a 500 nmol de N-NO_3^- .

2.3.3. Análise de N-Amônio (N-NH_4^+)

O método usado para a análise de N-NH_4^+ foi de Mitchell (1972). 200 μL das amostras ou seivas, em triplicata, foram diluídos, com 300 μL de água. Foram adicionados 2,5 mL da solução A (fenol, sódio nitroprussida, água) e 2,5 mL da solução B (hidróxido de sódio, fosfato de sódio bifásico, hipoclorito de sódio, água). Os tubos foram agitados e, após 30 min de repouso foram feitas as leituras de absorvância a 630 nm em espectrofotômetro (FEMTO, 435).

Foi feita uma curva padrão com cloreto de amônio nas concentrações de 50 a 300 nmol de N-NH_4^+ .

2.3.4. Análise de N-Ureídeos totais (URE)

A análise de nitrogênio sob a forma de ureídeos totais na seiva do xilema foi baseada na metodologia de Vogels & Van der Drift (1970). Em triplicata, foram misturados 75 µL de seiva, diluídos em 675 µL de água destilada, a 250 µL de NaOH 0,5 N. Os tubos foram agitados, tampados com bolas de vidro, imediatamente aquecidos em banho-maria a 100 °C por 8 min e posteriormente resfriados por imersão em banho de gelo.

Foram adicionados 250 µL de HCl 0,65 N a cada um dos tubos e estes foram novamente aquecidos em banho-maria a 100 °C por 4 min, e novamente resfriados em banho de gelo. Foram então adicionados 250 µL de tampão fosfato 0,4 M a pH 7,0 e 250 µL de fenilhidrazina. Os tubos foram agitados e deixados em temperatura ambiente por 5 minutos. Após este período, os tubos foram colocados em água gelada e a eles foram acrescentados 1,25 mL de HCl concentrado gelado e 250 µL de ferricianeto de potássio gelado. Os tubos foram agitados e deixados em temperatura ambiente por 10 min. As leituras de absorvância foram realizadas a 535 nm em espectrofotômetro (FEMTO, 435).

Foi feita uma curva padrão com alantoína nas concentrações de 12 a 50 nmols de alantoína.

2.4. Análise do solo

Assim que o solo utilizado nos vasos foi coletado, foram retiradas amostras para a análise de N total e matéria orgânica e estas realizadas pelo Instituto Campineiro de Análise de Solo e Adubo S/C Ltda.

2.5. Análise estatística

Foi utilizada uma análise de variância simples, seguida do cálculo da diferença mínima significativa (DMS) pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Utilizou-se o programa estatístico VARPC.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Enzimas e metabólitos relacionados com a assimilação do nitrogênio

Analisando-se a atividade específica da nitrogenase, observou-se que Inga apresentou maior ARA aos 7 e 10 meses de idade que as outras espécies que apresentaram nodulação (fig. 3.1A).

Estes resultados foram bastante inferiores aos obtidos por Miranda (2002) em plantas de *Crotalaria juncea* com 2 meses de idade (33 μmol etileno/g nod.h) e aos de plantas de *Glycine max* cuja ARA oscilou entre 20 e 30 μmol etileno/g nod.h (Gomes & Sodek, 1987).

Quanto à atividade da RN, enzima que age na redução do NO_3^- para NO_2^- , observou-se que foi necessário induzir a enzima com a presença de fonte de nitrogênio (atividade potencial) para obter atividades significativas. Em plantas irrigadas com água só foi observada atividade potencial da RN em folhas e *Lonchocarpus* foi a espécie que apresentou o maior valor. Em raízes, foi observada uma atividade potencial muito baixa apenas em *Myroxylon* (fig. 3.2A). Nos ensaios feitos com solução de Hoagland (-N) não foram encontradas atividades reais nem potenciais da RN em folhas, mas, em raízes de *Lonchocarpus* e *Myroxylon* foram detectadas atividades potenciais relativamente baixas (fig. 3.2B). Nos ensaios com solução completa de Hoagland (+ NO_3^-), observou-se que *Centrolobium* apresentou maior atividade potencial da RN em folhas que Inga e *Lonchocarpus*, enquanto que em *Myroxylon* não foi detectada atividade. Nas raízes, *Myroxylon* apresentou maior atividade real que Inga. Em *Centrolobium* foi registrada baixa atividade e em *Lonchocarpus* esta não foi detectada.

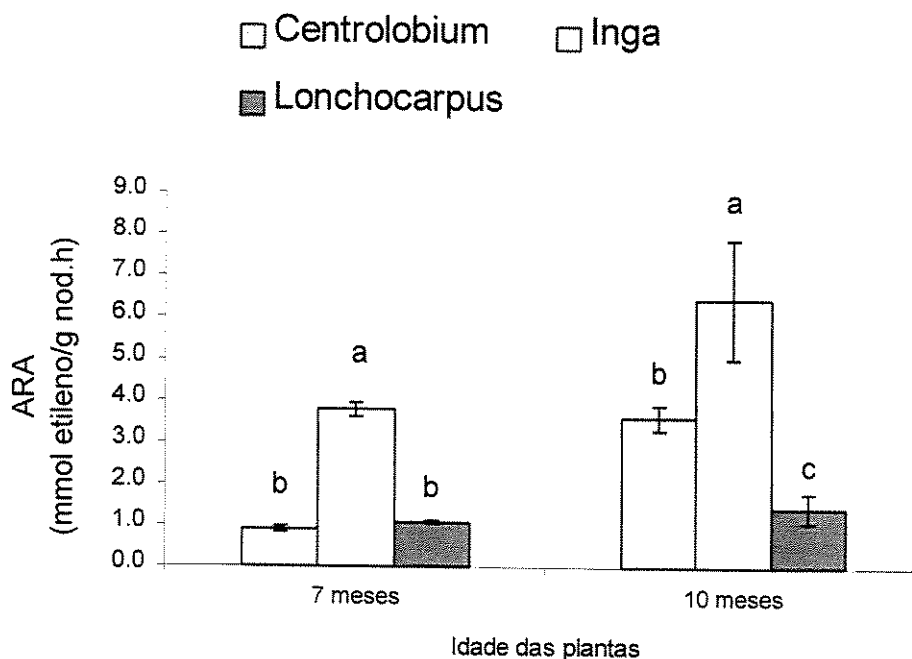


Figura 3.1. Atividade da Nitrogenase (ARA) das espécies estudadas que apresentam nódulos radiculares, aos 7 e 10 meses de idade. Tukey a 5 % de probabilidade. As letras comparam as diferentes espécies dentro de cada idade.

No entanto, com presença de NO_3^- no tampão, a maior atividade potencial nas raízes foi registrada em Inga. Em Myroxylon também foi registrada uma atividade relativamente alta e em Centrolobium e Lonchocarpus foram detectadas baixas atividades (fig. 3.2C).

Como em outras espécies estudadas por vários autores, a atividade da RN em folhas foi induzida pela presença de NO_3^- no substrato (Candella *et al.*, 1957; Hageman & Flesher, 1960; Heimer & Filner, 1971; Aidar, 1992; Sanches, 1997). Era de se esperar também nestes tratamentos encontrar as maiores atividades da RN nas folhas, como efetivamente aconteceu, sendo maior a atividade nas plantas irrigadas com solução de Hoagland (+N) e menor naquelas irrigadas com água. Bustamante *et al.* (1997) encontraram em folhas de espécies lenhosas do

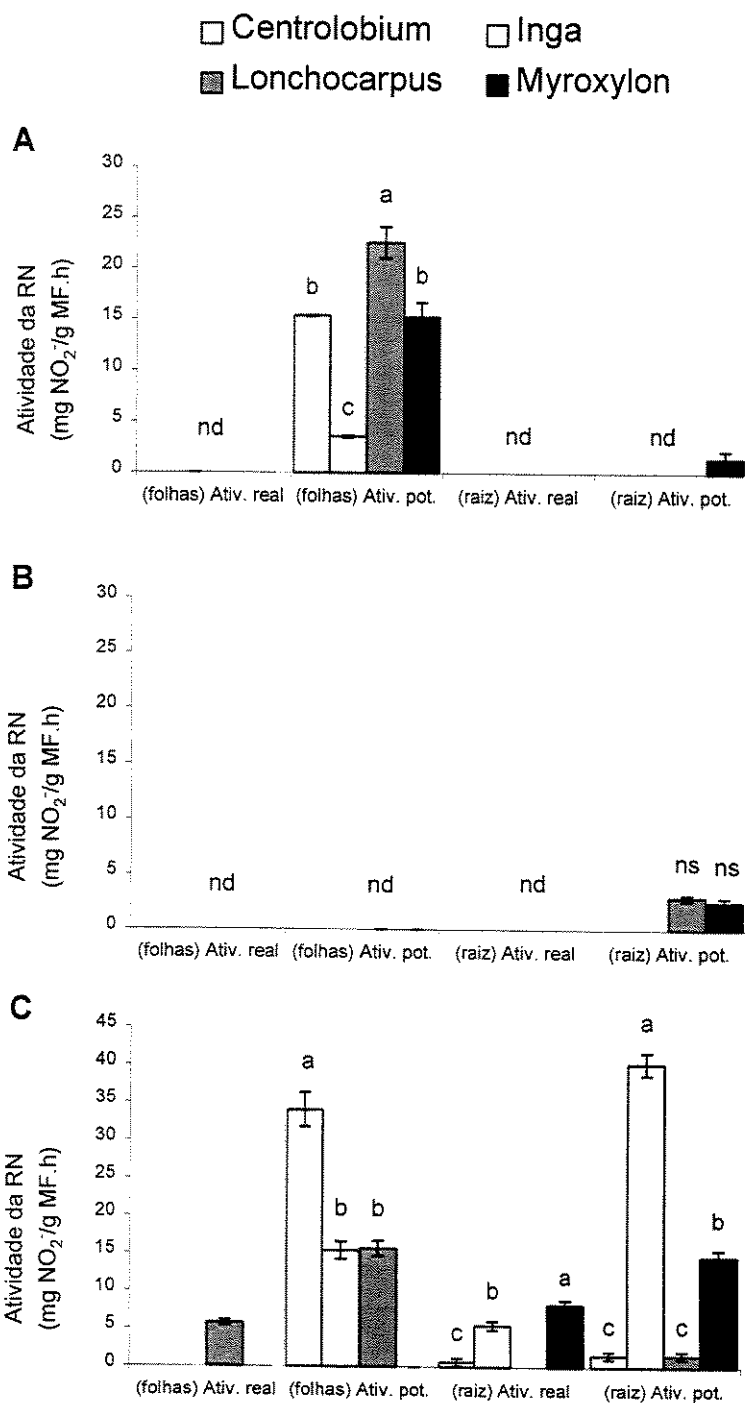


Figura 3.2. Atividade da RN nas espécies estudadas, aos 9 meses de idade. Plantas irrigadas com água corrente (A), plantas irrigadas com solução nutritiva de Hoagland -N (B) e plantas irrigadas com solução nutritiva completa (+N)(C) durante um mês. Tukey a 5 % de probabilidade. As letras comparam diferentes espécies dentro de cada estrutura. nd = atividade não detectada.

cerrado ao sul de Brasília, atividade potencial da RN de 4,37 e atividade real de 0,24 $\mu\text{mol NO}_2^-/\text{cm}^2\cdot\text{h}$ em espécies de *Pterodon pubescens*; 5,47 e 0,24 $\mu\text{mol NO}_2^-/\text{cm}^2\cdot\text{h}$ de atividade potencial e real, respectivamente, em espécies de *Dalbergia miscolobium* e 2,35 e 0,06 $\mu\text{mol NO}_2^-/\text{cm}^2\cdot\text{h}$ de atividade potencial e real, respectivamente, em espécies de *Qualea parvifolia*. Segundo os autores nesta última espécie ocorreu também assimilação nas raízes.

Andrews (1986) afirmou que as plantas podem assimilar o NO_3^- tanto nas raízes como na parte aérea e que, apesar destas características serem geneticamente controladas, podem sofrer influência das condições ambientais. Segundo Stewart & Orebanjo (1983) e Smirnoff *et al.* (1984) as espécies pioneiras ou de sítios com elevada luminosidade apresentam altos níveis de atividade na RN foliar.

A atividade enzimática seguinte, de redução do NO_2^- para NH_4^+ pela enzima redutase de nitrito (NiR), não foi testada para as espécies em estudo e também não foi analisado o conteúdo de NO_2^- nos diferentes órgãos das plantas. Entretanto, é de se esperar que o NO_2^- produzido seja rapidamente reduzido para evitar altas concentrações que poderiam ocasionar toxicidade à nitrogenase (Haynes & Goh, 1978). Segundo Kramer & Boyer (1995), o complexo enzimático RN-NiR funciona em coordenação e sua atividade é muito sensível às variações ambientais (a atividade aumenta com o aumento da temperatura e da luz), ao substrato (a atividade aumenta com a presença de NO_3^- no substrato) e ao produto final (a atividade diminui pelo acúmulo de NH_4^+). Por este motivo, o complexo enzimático é sintetizado “*de novo*” e a sua atividade está sujeita à expansão e à idade foliar. Ele depende da atividade fotossintética da folha, pois é um processo que consome energia e cerca de 20 % dos elétrons produzidos na fotossíntese são utilizados para a redução do nitrato (Kaiser & Huber, 1994). Pimentel (1998) comenta que a assimilação do amônio ocorre principalmente na raiz,

devido à toxicidade deste composto e requer uma grande quantidade de esqueletos de C oriundos do ciclo de Krebs, para a sua incorporação como composto orgânico.

O complexo enzimático GS-GOGAT é o responsável pela incorporação do NH_4^+ a compostos orgânicos. Nas reações catalisadas por este complexo, o glutamato é o aceptor inicial do NH_4^+ e a amida glutamina é formada com consumo de ATP. A GOGAT catalisa a transferência do grupo amino ($-\text{NH}_2$) para um segundo oxoglutarato proveniente do ciclo de Krebs, consumindo NADH ou NADPH e formando 2 moléculas de glutamato; uma delas é requerida para a manutenção da assimilação do NH_4^+ , enquanto a outra é transferida para a formação de outras amidas, URE e aminoácidos, utilizando os compostos intermediários da fotossíntese, glicólise ou ciclo de Krebs. Consequentemente, qualquer fator ambiental que afete o metabolismo de C, interferirá na assimilação de N (Wallsgrave *et al.*, 1983).

Em geral, foi observada baixa atividade desta dupla de enzimas nas espécies em estudo em comparação com a atividade de outras espécies de leguminosas não arbóreas (Sawazaki, 1986; Tonin 1988; Zanella, 2001). Miranda (2002) menciona que a atividade da GS observada em *Crotalaria juncea* foi de 3681 $\mu\text{mol GGH/mg prot.h}$ para folhas, 448 $\mu\text{mol GGH/mg prot.h}$ para raízes e 4237 $\mu\text{mol GGH/mg prot.h}$ para nódulos, enquanto a atividade da GOGAT-NADH foi 0,24 $\mu\text{mol NADH/mg prot.h}$ para folhas, 9,50 $\mu\text{mol NADH/mg prot.h}$ para raízes e 150,0 $\mu\text{mol NADH/mg prot.h}$ para nódulos. É muito possível que, no presente trabalho, estas enzimas tenham sido desestabilizadas pelo DTT utilizado no tampão de extração, já que, segundo Wallsgrave *et al.* (1983), em ervilha e cevada a atividade de GS-GOGAT aumentou significativamente na ausência de DTT. Estes mesmos autores comentaram que existem dois tipos de isoenzimas da GS, a GS1 citoplasmática ou citosólica e

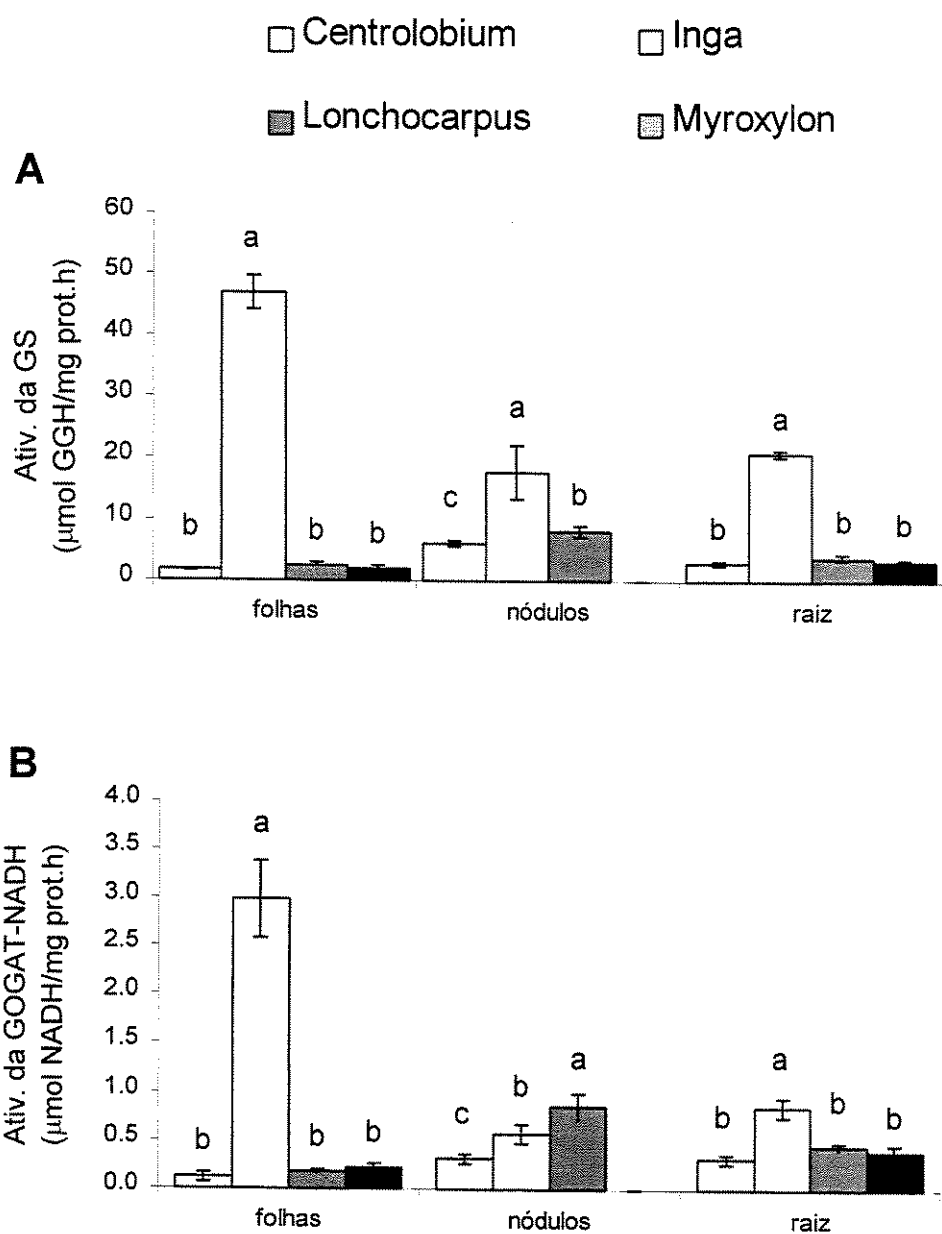


Figura 3.3. Atividade da GS (A) e da GOGAT-NADH (B) nas espécies estudadas, aos 8 meses de idade. Tukey a 5% de probabilidade. As letras comparam as diferentes estruturas das plantas.

a GS2 cloroplástica ou plastidial, que diferem uma da outra pela presença de um grupo ativo thiol. Lam *et al.* (1996) comentaram que as proporções das duas GS podem variar segundo as espécies, estágio de desenvolvimento e condições ambientais, mas Limani *et al.* (1999) enfatizaram que a GS2 cloroplástica encontra-se em maior proporção nos tecidos fotossintéticos, enquanto a GS1 citoplasmática está presente em maior proporção nas raízes e nódulos. Em Inga, a atividade foi maior nas folhas e, em Myroxylon, foi maior nas raízes. Em folhas de Inga (que aliás apresentaram as maiores taxas fotossintéticas, Cap. 2) a atividade da GS talvez possa ter sido correspondente à GS2 cloroplástica, que, segundo Lam *et al.* (1995), possui a função de assimilar tanto o NH_4^+ oriundo da redução do nitrito nos plastídeos quanto o NH_4^+ fotorrespirado. A presença de GS2 em folhas é provavelmente regulada pela luz e correlacionada à capacidade fotorrespiratória das plantas (Migge *et al.*, 2000; Fuentes *et al.*, 2001). Em Centrolobium e Lonchocarpus, a atividade da GS nos nódulos foi maior que em folhas e raízes, possivelmente em virtude do fluxo de NH_4^+ liberado dos bacteróides em função da redução do N_2 (Limani *et al.*, 1999).

Comparando a atividade da GS nas diferentes espécies, encontrou-se que Inga apresentou uma atividade muito maior que as outras espécies, tanto em folhas, como em nódulos e raízes (fig. 3.3A). Observou-se que Inga também apresentou maior atividade da GOGAT-NADH que as outras espécies, em folhas e raízes. Já, em nódulos, Lonchocarpus apresentou a maior atividade (figura 3.3B).

Quanto aos metabólitos relacionados à assimilação do N, foram observadas concentrações relativamente baixas de NH_4^+ , primeiro produto intermediário da FBN nos tecidos, provavelmente porque este deve ser rapidamente assimilado para evitar concentrações tóxicas às células foliares e radiculares. Em folhas de Centrolobium foram encontradas as maiores

concentrações de NH_4^+ , seguido por *Lonchocarpus*, *Myroxylon* e *Inga*. Nas raízes de *Inga* foram observadas maiores concentrações que nas outras espécies, cujas concentrações foram estatisticamente iguais. Os nódulos de *Inga* apresentaram concentrações relativamente altas, enquanto que, em nódulos de *Lonchocarpus* as concentrações foram as menores. Foram observados apenas traços de NH_4^+ na seiva do xilema em todas as espécies, com exceção de *Myroxylon*, que apresentou concentrações relativamente maiores (tab. 3.1, N- NH_4^+). Em *Crotalaria juncea* (Miranda, 2002) as concentrações de NH_4^+ em folhas, raízes e nódulos foram bastante inferiores às encontrados nas espécies em estudo.

Quanto à presença de N-NO_3^- nos tecidos, observou-se que *Myroxylon* e *Inga* foram as espécies com maior concentração de N-NO_3^- nas folhas. Em raízes, *Centrolobium* e *Lonchocarpus* apresentaram as maiores concentrações de N-NO_3^- e, em nódulos, *Centrolobium* apresentou as maiores concentrações. No entanto, analisando o nitrato transportado pela seiva do xilema, observou-se que *Lonchocarpus* apresentou maiores concentrações que *Inga*, *Centrolobium* e *Myroxylon*, que foram estatisticamente iguais (tab. 3.1, N- NO_3^-).

O acúmulo do N-NO_3^- nos tecidos de *Inga* e *Myroxylon* pode sugerir que uma boa parte do N-NO_3^- absorvido pode ter sido transportada da raiz até as folhas via seiva do xilema para ser reduzido mais ativamente nas folhas. Em *Lonchocarpus* e *Centrolobium* o N-NO_3^- pode estar sendo reduzido tanto nas raízes como nas folhas. Haynes & Goh (1978) comentaram que as raízes e as folhas apresentam-se como os sítios de assimilação do N, sendo que nas raízes, o N pode ser absorvido na forma de NO_3^- ou NH_4^+ ou obtido a partir do N_2 via FBN nos nódulos e os produtos da assimilação translocados pela seiva do xilema à parte aérea. Estes mesmos autores afirmam que a assimilação do N nas folhas pode ser dada pela redução do N-NO_3^-

excedente translocado das raízes à parte aérea, quando este não foi reduzido no sistema radicular. Portanto, o acúmulo de N-NO_3^- nas folhas das 4 espécies estudadas proveio do sistema radicular.

Tabela 3.1. Metabólitos relacionados com a assimilação do nitrogênio nas espécies estudadas, aos 10 meses de idade. Tukey a 5 % de probabilidade. As letras comparam as diferentes espécies para cada estrutura.

N- NH_4^+ ($\mu\text{mol NH}_4^+/\text{g M.F}$)				
Estruturas	Centrolobium	Inga	Lonchocarpus	Myroxylon
Folhas	<u>1,43</u> a ($\pm 0,64$)	0,46 c ($\pm 0,46$)	0,98 b ($\pm 0,07$)	0,47 c ($\pm 0,05$)
Nódulos	2,02 b ($\pm 0,98$)	<u>6,08</u> a ($\pm 0,04$)	0,83 c ($\pm 0,20$)	————
Raízes	1,42 b ($\pm 0,14$)	<u>1,88</u> a ($\pm 0,35$)	1,44 b ($\pm 0,63$)	1,23 b ($\pm 0,69$)
Seiva ($\mu\text{mol NH}_4^+/\text{mL}$)	0,07 b ($\pm 0,02$)	0,06 b ($\pm 0,02$)	0,04 c ($\pm 0,01$)	<u>0,15</u> a ($\pm 0,03$)

N- NO_3^- ($\mu\text{mol NO}_3^-/\text{g M.F}$)				
Estruturas	Centrolobium	Inga	Lonchocarpus	Myroxylon
Folhas	8,08 c ($\pm 0,69$)	<u>31,12</u> a ($\pm 4,23$)	15,60 b ($\pm 1,47$)	<u>32,49</u> a ($\pm 5,61$)
Nódulos	<u>21,67</u> a ($\pm 1,61$)	14,33 b ($\pm 1,13$)	4,92 c ($\pm 0,87$)	————
Raízes	<u>11,73</u> a ($\pm 2,74$)	5,71 b ($\pm 1,32$)	<u>11,22</u> a ($\pm 2,28$)	4,61 b ($\pm 1,026$)
Seiva ($\mu\text{mole nitrato/mL}$)	0,38 b ($\pm 0,12$)	0,42 b ($\pm 0,08$)	<u>3,35</u> a ($\pm 0,98$)	0,30 b ($\pm 0,17$)

N-URE ($\mu\text{mol alantoína/mL}$)				
Estruturas	Centrolobium	Inga	Lonchocarpus	Myroxylon
Seiva	1,19 b ($\pm 0,02$)	0,64 c ($\pm 0,01$)	<u>2,82</u> a ($\pm 0,08$)	0,33 d ($\pm 0,01$)

ALT ($\mu\text{mol leucina/g M.F}$)				
Estruturas	Centrolobium	Inga	Lonchocarpus	Myroxylon
Folhas	1,37 b ($\pm 0,31$)	<u>2,12</u> a ($\pm 0,58$)	<u>2,20</u> a ($\pm 0,18$)	1,16 c ($\pm 0,17$)
Nódulos	<u>6,59</u> a ($\pm 0,83$)	5,39 b ($\pm 0,55$)	3,14 c ($\pm 0,66$)	—
Raiz	1,02 c ($\pm 0,38$)	1,48 b ($\pm 0,14$)	<u>2,47</u> a ($\pm 0,23$)	0,75 d ($\pm 0,26$)
Seiva ($\mu\text{mole leucina/mL}$)	0,13 c ($\pm 0,01$)	0,26 b ($\pm 0,01$)	<u>0,34</u> a ($\pm 0,03$)	0,23 b ($\pm 0,04$)

Pimentel (1998), mencionou que a redução de NO_3^- ocorre preferencialmente em tecidos fotossintetizantes, devido à grande demanda de elétrons, que são fornecidos pelo fotossistema I na presença de luz. Embora estas reações ocorram preferencialmente em folhas, a assimilação, tanto em folhas como em raízes, depende de características genéticas da planta, podendo haver troca de sítio de redução em resposta às condições ambientais (Wallsgrave *et al.* 1983; Bustamante *et al.*, 1997; Silveira *et al.*, 2001). Além disso, é importante levar em conta que a fotorrespiração favorece o aumento da concentração de NO_3^- nos tecidos, já que, neste processo, há liberação de 1 molécula de NO_3^- procedente de 2 moléculas de glicina. Segundo Wallsgrave *et al.* (1983), a liberação deste NO_3^- pode ser 10 vezes maior que a da assimilação primária do N. Estas moléculas de nitrato liberadas são re-assimiladas pelo complexo enzimático GS-GOGAT (Keys *et al.*, 1978; Oliveira *et al.*, 2001).

Ao relacionar a atividade da RN com os acúmulos relativamente altos de NO_3^- nas folhas, sugere-se que, sendo o NO_3^- atóxico, ele pode ser armazenado nos vacúolos das células (radiculares ou foliares) para posteriormente ser reduzido a NO_2^- pela NiR. Como estes processos de absorção e assimilação precisam de energia, esta energia possivelmente é melhor suprida pelas células foliares que pelas células radiculares. Mas também as células radiculares

podem fornecer esta energia, como foi visto nas raízes de Inga, nas quais a atividade da RN foi maior que em folhas quando foi feita irrigação com solução de Hoagland completa. Andrews (1986) menciona que a maior proporção da assimilação do nitrato nas folhas, pode ser explicada pela alta absorção do NO_3^- associada à não indução da atividade da RN nas raízes. Desta forma, o NO_3^- que não é assimilado nas raízes é transportado para a parte aérea via xilema e o balanço nos níveis de NO_3^- é mantido pela RN.

Quanto à presença de URE na seiva do xilema como produto da FBN, *Lonchocarpus* foi a espécie que apresentou a maior concentração, sendo que em *Centrolobium* também foi encontrada uma concentração considerável de URE. Em Inga e *Myroxylon* foram registrados apenas traços de URE (tab. 3.1, URE). Estes valores foram baixos quando comparados aos valores registrados por vários autores. Sodek & Silva (1996) mencionaram 20 μmol URE/mL de seiva em soja nodulada e traços de URE em plantas de soja não nodulada e Tonin (1988) comentou que em soja, 86% do N existente na seiva do xilema está em forma de URE quando a planta é totalmente dependente da FBN. Miranda (2002) observou em plantas de *Crotalaria juncea* inoculadas, menos de 0,3 μmol URE/mL de seiva. Segundo Goi & Neves (1982), as maiores concentrações de URE em seiva são encontradas em espécies de leguminosas cujos nódulos são do tipo determinado. No entanto, os nódulos de *Lonchocarpus* são de tipo indeterminado e esta espécie é produtora de URE. McClure & Israel (1979), dentre outros autores, comentaram que os URE estão associados à FBN, mas em plantas não noduladas é factível encontrar pequenas quantidades de URE, como foi o caso registrado para *Myroxylon*, neste estudo. Os URE, após a transferência aos órgãos em desenvolvimento via seiva do xilema, são metabolizados a outros compostos nitrogenados (Yoneyama & Ishizuka, 1982).

Com respeito à presença de ALT na seiva do xilema, *Lonchocarpus* apresentou a maior concentração e *Centrolobium* registrou a menor concentração (tab. 3.1, ALT). Miranda (2002)

mencionou uma concentração de 2,75 μmol de ALT/mL em seiva de *Crotalaria juncea*, espécie não considerada produtora de URE e cujo valor foi 10 vezes maior que os encontrados em *Centrolobium*, *Inga* e *Myroxylon*.

Por outro lado, também foi registrada a maior presença de ALT nas folhas e raízes de *Lonchocarpus*, enquanto que *Myroxylon* apresentou as menores concentrações. Em nódulos, a maior presença de ALT foi registrada em *Centrolobium* (tab.3.1, ALT). Em geral, a presença de ALT nos nódulos destas três espécies pode sugerir que estes também foram produtos da FBN. Sawazaki (1986), dentre outros autores, mencionou que a rápida e eficiente utilização do NH_4^+ como íon intermediário da assimilação do N pode ser refletida no aumento de ALT na seiva do xilema. Isto foi efetivamente observado nestas quatro espécies, já que não foram encontradas altas concentrações deste íon na seiva do xilema. Em *Crotalaria juncea* (Miranda, 2002) as concentrações de ALT em folhas, raízes e nódulos foram quase 10 vezes maiores que as encontradas nas 4 espécies em estudo.

A concentração de N total e de matéria orgânica no solo utilizado nos vasos para plantio das espécies estudadas foram de 4,6 g N e 44 g de matéria orgânica/dm³ de solo. Devito (2002) comenta que a matéria orgânica do solo pode possuir N em concentração suficiente para as necessidades de absorção mineral da planta e Yamada (1995, 1996) comenta que o N do solo pode estar na forma orgânica, proveniente de resíduos de outros vegetais ou animais, na forma mineral, presente na solução do solo ou adsorvido às argilas e na forma gasosa, nos poros do solo. A passagem de uma forma a outra se dá pela atividade microbiana. Fernandes & Rossiello (1995, citados por Pimentel, 1998), mencionam que em solos tropicais, com alternância de estações secas e chuvosas, há aumento súbito na disponibilidade de nitrato no início da estação chuvosa, devido à rápida degradação de matéria orgânica e ao aumento da população de microrganismos do solo. As bactérias de decomposição atuam sobre o material

orgânico nitrogenado, liberando aminoácidos pela hidrólise das proteínas. As bactérias amonificantes liberam os grupos amino na forma de íons amônio dos aminoácidos que se dissolvem na solução do solo. Estes íons podem ser absorvidos pela planta, para sua posterior conversão a nitrito e nitrato e incorporado em compostos orgânicos que serão utilizados pelos tecidos (Haynes & Goh, 1978).

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aidar, M.P., 1992. Ecologia do araribá (*Centrolobium tomentosum* Guill. ex Benth – Fabaceae) e o ecótono Mata Ciliar da Bacia do Rio Jacaré - Pepira, SP., Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil, tese de Mestrado.
- Aidar, M.P., 2000. Ecofisiologia das estratégias de utilização de nitrogênio em árvores da floresta neotropical. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil, tese de Doutorado.
- Andrews, M., 1986. The partitioning of nitrate assimilation between root and shoot of higher plants. *Plant Cell Environ.* 9: 511-519.
- Atkins, C.A., Rainbird, R. & Pate, J.S, 1980. Evidence for a purine pathway of ureide synthesis in N₂-fixing cowpea (*Vigna unguiculata* l. walp). *Z. Pflanzenphysiol* 97: 249-260.
- Arnon, D.J., 1949. Copper enymes in isolated chloroplast polyphenoloxidases in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.* 24: 1-15.
- Azcon-Bieto, J. & Talon, M., 1993. Fisiologia y Bioquímica Vegetal. Interamericana McGraw-Hill. España, 581p.
- Barroso, G.M., Morim, M.P., Peixoto, A.L. & Ichaso, C.L., 1999. Frutos e sementes. Morfologia aplicada à sistemática de dicotiledôneas. Editora UFV, Universidade Federal de Viçosa, MG, Brasil, 443p.
- Bazzaz, F.A. & Pickett, S.T., 1980. Physiological ecology of tropical succession: a comparative review. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 11: 287-310.
- Bergersen, F.J. & Turner, G.L, 1967. Nitrogen fixation by the bacteroid fraction of breis of soybean root nodules. *Biochim. Biophys. Acta* 141: 507-515.

- Bielecki, L.R. & Turner, N.A., 1966. Separation and estimation of amino acids in crude plant extracts by thin-layer electrophoresis and chromatographs. *Anal. Biochem.* 17: 278-293.
- Boland, M., Hanks, J., Reynolds, P., Blevins, D., Tolbert, N. & Schubert, K., 1982. Subcellular organization of ureide biogenesis from glycolytic intermediates and ammonium in nitrogen-fixing soybean nodules. *Planta* 155: 45-51.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Bremner, J.M., 1965a. Total nitrogen. IN: *Methods of soil analysis*. (C.A., Black, ed.), Madison, Am. Soc. Agr., pp. 1149-1178.
- Bremner, J.M., 1965b. Inorganic forms of nitrogen. IN: *Methods of soil analysis*. (C.A., Black, ed.), Madison, Am. Soc. Agr., pp. 1179-1237.
- Brown, S. M. & Walsh, K. B., 1994. Anatomy of the legume nodule cortex with respect to nodule permeability. *Aust. J. Plant Physiol.* 21: 49 – 68.
- Bustamante, M.M., Kozovits, A.R., Silva, L.F., Duarte, G.F. & Castro, A.A., 1997. Assimilação de nitrato e taxas fotossintéticas de três espécies lenhosas de Cerrado. IN: *Contribuição ao conhecimento ecológico do Cerrado - Trabalhos selecionados do 3º Congresso de Ecologia do Brasil* (Brasília, 6-11/10/96). (L. Leite and C. Saito, org.), Universidade de Brasília, Brasília D.F, Brasil, pp. 49-53.
- Buttery, B. R. & Dirks, V. A., 1987. The effects of soybean cultivar, *Rhizobium* strain and nitrate on plant growth mass and acetylene reduction rate. *Plant Soil.* 98: 285-293.
- Cancian, M.A., 1999. Efeito do sombreamento e da temperatura do substrato na

- nodulação e desenvolvimento inicial de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan, *Lonchocarpus muehlbergianus* Hass e *Cyclolobium vecchi* A. Samp. Ex Hoehne. Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, SP, Brasil, tese de Doutorado.
- Candella, M.I., Fisher, E.G. & Hewitt, E.J., 1957. Molybdenum as a plant nutrient. X. Some factors affecting the activity of nitrate reductase in cauliflower plants grown with different nitrogen sources and molybdenum levels in sand culture. *Plant Physiol.* 32: 280-288.
- Cataldo, D.A., Haroon, M., Schrader, L.E. & Youngs, U.L., 1975. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. *Comm. Sci. Pl. Anal.* 6: 71-80.
- Ceulemans, P.J. & Saugier, B., 1991. Photosynthesis. IN: *Physiology of trees*. (A.S., Raghavendra, ed.), Wiley-Interscience, New York, pp. 21-50.
- Corby, H.D., 1981. The systematic value of leguminous root nodules. IN: *Advances in legume Systematics*, Part 2. (R. Polhill and P. Raven, eds.), Royal Botanic Gardens Kew, pp.657-669.
- Cordeiro, L., Sprent, J.I. & McInroy, S.G., 1996. Some developmental and structural aspects of nodules of *Lonchocarpus muehlbergianus* Hassl. *Naturalia*, São Paulo. 21: 9-21.
- Corré, W.J., 1983. Growth and morphogenesis of sun and shade plants. I. The influence of light intensity. *Acta Bot. Neerl.* 32: 49-62.
- Cullimore, J., Lea, P. & Mifflin, B.J., 1982. Multiple forms of glutamine synthetase in the plant fraction of Phaseolus root nodules. *Israel J. Bot.* 31: 155-162.
- Dalling, M.J., 1985. The physiological basis of nitrogen distribution during grain filling in cereals. IN: *Exploitation of physiological and genetic variability to enhance crop*

- productivity. (J.E., Harper, L.E., Schrader & R.W., Howell, eds.), Am. Soc Plant Physiol, Rockville, pp. 55-78.
- Davidovich, B., 1980. Técnicas de laboratorio de los análisis de semillas. Boletín de Divulgación Técnica, N° 48.
- Devito, L.L., 2002. Comparação da nodulação de *Chamaecrista desvauxii* Vogel em solos de quatro áreas do estado de São Paulo. Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, SP, Brasil, tese de Mestrado.
- Dias-Filho, M.B., 1999. Physiological responses of two tropical weeds to shade. I. Growth and biomass allocation. Pesq. Agropec. Bras. 34 (6): 945-952.
- Dixon, R., O. & Wheeler, C. T., 1986. Nitrogen fixation in plants (eds.). Backfield, Son Ltd. Glasgow. 157p.
- Dougal, D.K., 1974. Evidence for the presence of glutamate synthase in extracts of carrol cell cultures. Biochem. Biophys. Res. Comum. 58: 693-649.
- Doyle, J., 1994. Phylogeny of the legume family: an approach to understanding the origins of nodulation. Ann. Rev. Ecol. Syst. 25: 325-349.
- Elevitch, C. & Wilkinson, K., 1998-99. Nitrogen fixing tree start-up guide. AgroForester. <http://www.agroforester.com>
- Eschenbach, C., Glauner, R., Kleiner, M. & Kappen, L., 1998. Photosynthesis rates of seleted tree species in lowland dipterocarp rainforest of Sabah, Malaysia. Trees 12: 356-365.
- Esteves, T.R., 1985. Eficiência de absorção de nitrogênio por genótipos de milho (*Zea mays* L.). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil, tese de Mestrado.
- Evans, J.R., 1989. Photosynthesis and nitrogen relationships in leaves of C3 plants.

- Oecologia. 78: 9-19.
- Faria, S.M. & Lima, H.C., 1998. Additional studies of the nodulation status of leguma species in Brazil. Plant Soil 200: 185-192.
- Faria, S.M.; Lewis, G.P., Sprent, J.I. & Sutherland, J.M., 1989. Ocorrence of nodulation in the Leguminosae. New Phytol. 111: 607-619.
- Faria, S.M.; Lima, H.C., Franco, A.A., Mucci, E.S. & Sprent, J.I., 1987. Nodulation of legume trees from South East Brazil. Plant Soil 99: 347-356.
- Faria, S.M., Franco, A.A., Jesus, R.M., Menandro, M.S., Baitello, J.B., Mucci, E.S., Dobereiner, J. & Sprent, J.I., 1984a. New nodulating legume trees from South-East Brazil. New Phytol. 98: 317-327.
- Faria, S. M., Franco, A. A., Menandro, M. J., Jesus, R. M., Baitello, J. B., Aguiar, O. T. & Dobereiner, J., 1984b. Survey on nodulation of indigenous legume trees in southeast Brazil. Pesq. Agrop. Bras.19: 143-153.
- Faria, S.M., Franco, A.A., Menandro, M.J., Jesus, R.M., Baitello, J.B., Aguiar, O.T. & Dobereiner, J., 1984b. Survey on nodulation of indigenous legume trees in southeast brazil. Pesq. Agrop. Bras.19: 143-153.
- Farquhar, G.D. & Sharkey, T.D., 1982. Stomatal condutance and photosynthesis. Ann. Rev. Plan Physiol. 33: 317-345.
- Ferguson, A.R. & Sims, A.P., 1971. Inactivation *in vivo* of glutamine synthetase and NAD specific glutamate dehydrogenase: its role in the regulation of glutamine synthesis in yeasts. J. Gen. Microbiol. 69: 423-427.
- Fisher, R., 1921. Some remarks on the methods formulated in a recent article on "The quantitative analysis of plant growth". Ann. Appl Biol 7: 367-372.
- Frankland, B., 1986. Perception of light quantity. IN: Photomorphogenesis in plants (R.

- Kendrick and C. Kronenberg, eds.), Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht., pp. 219-235.
- Fred, E.B. & Waksman, S.A., 1928. Yeast extract mannitol agar. Laboratory Manual of General Microbiology. McGraw Hill. New York, 145p.
- Fuentes, S. I., Allen, D. J., Ortiz-Lopez, A. & Hernandez, G., 2001. Over-expression of cytolitic glutamine synthetase increases photosynthesis and growth at low nitrogen concentrations. J. Exp. Bot. 52: 1071-1081.
- Gandolfi, S., 2000. História natural de uma floresta estacional semidecidual no Município de Campinas (São Paulo, Brasil), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil, tese de Doutorado.
- Gomes, M.A. & Sodek, L., 1987. Reproductive development and nitrogen fixation in soybean (*Glycine max* [L.] Merril). J. Exp. Bot. 38: 1982-1987.
- González-Rodríguez, A.M. & Morales, D. & Jiménez, M.S., 2002. Leaf gas exchange characteristics of a Canarian laurel forest tree species [*Persea indica* (L.) K. Spreng.] under natural conditions. J. Plant Physiol. 159: 695-704.
- Goi, S.R. & Neves, M. C., 1982. Teor de URE, tipo de nódulos e atividade da nitrogenase de leguminosas forrageiras, florestais e de grão. Pesq. Agrop. Bras. 17: 43-50.
- Gloser, V. & Gloser, J., 1996. Acclimation capability of *Calamagrostis epigejos* and *C. arundinaceae* to changes in radiation environment. Photosynthetica. 32: 202-212.
- Granstedt, R. & Huffaker, R., 1982. Identification of the leaf vacuole as a major nitrate storage pool. Plant Physiol. 70: 410-413.
- Gross, E., Cordeiro, L. & Caetano, F.H., 2002. Nodule ultrastructure and initial growth of *Anadenanthera peregrina* (L.) Speg. var. *falcata* (Benth) Altschul plants infected

- with Rhizobia. *Ann Bot.* 90: 175-183.
- Grime, J.P. & Hunt, R., 1975. Relative growth-rate: its range and adaptive significance in a local flora. *J. Ecol.* 63: 393-422.
- Hageman, R.H. & Flesher, D., 1960. Nitrate reductase activity in corn seedlings as affected by light and nitrate content of nutrient media. *Plant Physiol.* 35: 700-708.
- Hageman, R.H. & Hucklesby, P., 1971. Nitrate reductase from higher plants. *Methods Enzymol.* 23: 491-503.
- Hall, D.O. & Rao, K.K., 1994. *Photosynthesis. Studies in biology.* Cambridge University Press. Cambridge.
- Hall, D.O., Scurlock, J.M., Bolh  r-Nordenkamp, H.R., Leegood, R.C. & Long, S.P., (eds.), 1993. *Photosynthesis and production in a changing environment. A field and laboratory manual,* Chapman & Hall, London, 477p.
- Hardy, R.W., Holsten, R.D., Jackson, E.K. & Burns, R.C., 1968. The acetylene-ethylene assay for N₂ fixation: laboratory and field evaluations. *Plant Physiol.* 43: 1185-1207.
- Hartshorn, G.S., 1980. Neotropical forest dynamics. *Biotropica.* 12 (supplement): 23-30.
- Haynes, R.J. & Goh, K.M., 1978. Ammonium and nitrate nutrition of plants. *Biol. Rev.* 53: 465-510.
- Heichel, G. H. & Vance, C. P., 1983. *Physiology and morphology of perennial legumes: IN: Nitrogen fixation. Vol. 3. Legumes.* Oxford Univ. Press.
- Heimer, Y.M. & Filner, P., 1971. Regulation of the nitrate assimilation pathway in cultured tobacco cells. III. The nitrate uptake system. *Biochem. Biophys. Acta.* 230: 362-372.
- Hiscox, J.D. & Israelstam, G.F., 1978. A method for the extraction of chlorophyll from

- leaf tissue without maceration. Can. J. Bot. 57: 1332-1334.
- Hoagland, D.R. & Arnon, D.I., 1938. The water-culture method for growing plants without soil. Berkeley. University of California Agricultural Experiment Station, 39p.
- Hungria, M. & Araújo, R.S., (eds.). 1994. Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola. EMBRAPA. Serviço de Produção de Informação, Brasília, D.F., 542p.
- Hungria, M.; Barradas, C.A. & Wallsgrove, R.M., 1991. Nitrogen fixation, assimilation and transport during the initial growth stage of *Phaseolus vulgaris*. J. Exp. Bot. 42: 839-844.
- Hunt, R., 1982. Plant growth curves. The functional approach to plant growth analysis. Edward Arnold, London, 248p.
- Hunt, S. & Layzell, D.B., 1993. Gas exchange of legume nodules and the regulation of nitrogen activity. Annu. Rev. Plant Physiol. 44: 483-511.
- Inenami, T., Magalhães, E. & Válio, I.F., 1984. Detecção e identificação de um inibidor de germinação em sementes de *Myroxylon peruiferum* L. F. (Cabriúva). Anais IV. Congr. SBSP: 15-20.
- Ishida, A., Toma, T., Matsumoto, Y., Yap, S.P. & Maruyama, Y., 1996. Diurnal changes in leaf gas exchange characteristics in the uppermost canopy of a rain forest tree, *Dryobalanops aromatica* Gaertn. f. Tree Physiol. 16: 779-785.
- Ishida, A., Toma, T. & Marjenah, A., 1999. Limitation of leaf carbon gain by stomatal and photochemical processes in the top canopy of *Macaranga conifera*, a tropical pioneer tree. Tree physiol. 19: 467-473.
- Kaiser, W.M. & Huber, S.C., 1994. Posttranslational regulation of nitrate reductase in

- higher plants. *Plant Physiol.* 106: 817-821.
- Keys, A., Bird, I., Cornelius, M., Lea, P., Wallsgrove, R. & Miflin, B., 1978. Photorespiratory nitrogen cycle. *Nature.* 275: 741-743.
- Kitajima, K., 1994. Relative importance of photosynthetic traits and allocation patterns as correlates of seedling shade tolerance of 13 tropical trees. *Oecologia.* 98: 419-428.
- Klinge, H. & Rodrigues, W., 1971. Matéria orgânica e nutrientes na mata de terra firme perto de Manaus. *Acta Amazonica* 1(1): 69-72.
- Kramer, P. & Boyer, J., 1995. Water relations of plants and soils. Academic Press, San Diego.
- Lam, H. M., Coschigano, K., Oliveira, I., Melo-Oliveira, R. & Corruzzi, G., 1996. The molecular-genetics of nitrogen assimilation into amino acids in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* 47: 569-593.
- Lam, H. M., Coschigano, K., Schultz, C., Melo-Oliveira, R., Tjaden, G., Oliveira, I., Ngai, N., Hsieh, M. H. & Coruzzi, G., 1995. Use of arabidopsis mutants and genes to study amide amino acid biosynthesis. *Plant Cell.* 7: 887-898.
- Lambers, H., Chapin, F.S. & Pons, T.L., 1998. *Plant physiological ecology.* Springer-Verlag. New York, 540p.
- Lambers, H. & Poorter, H., 1992. Inherent variation in growth rate between higher plant: a search for physiological causes and ecological consequences. *Adv. Ecol. Res.* 23: 187-261.
- Larcher, W., 2000. *Ecofisiologia vegetal.* RiMa. São Carlos, 531p.
- Lehninger, A., 1976. Aminoácidos. IN: *Bioquímica.* (E. Blucher, ed.). Vol. 1. 2^a ed. São Paulo, 60p.

- Lichtenthaler, H.K., 1987. Chlorophylls and carotenoids: pigment of photosynthetic biomembranes. In: Colowick, S.P. & Kaplan, N.O. (eds.). Methods in enzymology. V. 148. New York, USA. Academic Press. Inc., pp. 350-382.
- Lima, H., 1985. *Centrolobium* Mart. Ex Benth (Leg.- Pap.): estudo taxonômico das espécies brasileiras extra-amazônicas. Arq. Jardim Botânico do Rio de Janeiro 27: 177-191.
- Limani, A., Phillipson, B., Ameziane, R., Pernolet, N, Jiang, Q., Roy, R., Deleens, E., Chaumont-Bonnet, M., Gresshof, P. M. & Hirel, B., 1999. Does root glutamine synthetase control plant biomass production in *Lotus japonicus* L.? Planta. 209: 495-502.
- Loach, K., 1970. Shade tolerance in tree seedlings. II. Growth analysis of plant raised under artificial shade. New Phytol. 69: 273-286.
- Lorenzi, H., 1992. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa, São Paulo, Editora Plantarum Ltda, 368p.
- McClure, P.R. & Israel, D.W., 1979. Transport of nitrogen in the xylem of soybean plants. Plant Physiol. 64: 411-416
- Magalhães, F.M., Magalhães, L.M., Oliveira, L.A. & Dobereiner, J., 1982. Ocorrência de nodulação em leguminosas florestais de terra firme nativas da região de Manaus-AM. Acta Amazonica 12(3): 509-514.
- Marschner, H., 1995. Mineral nutrition of higher plants. 2nd edition, Academic Press, San Diego.
- Matthes, L.A., 1980. Composição florística, estrutura e fenologia de uma floresta residual do planalto paulista: Bosque dos Jequitibás, Campinas, São Paulo. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil, tese de Mestrado.

- Matthes, L.A., 1992. Dinâmica da sucessão em mata, após a ocorrência de fogo -Santa Genebra- Campinas, SP. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil, tese de Doutorado.
- Migge, A., Carrayol, E., Hirel, B. & Becker, T. W., 2000. Leaf specific over-expression of plastidic glutamine synthetase stimulates the growth of transgenic tobacco seedlings. *Planta*. 210: 252-260.
- Mitchell, H.T., 1972. Microdetermination of nitrogen in plant tissues. *J. Assoc. Off. Agric. Chem.* 55: 1-3.
- Miranda, E. H., 2002. Fixação e reações de assimilação de N em *Crotalaria juncea* L. Universidade Estadual de Campinas. Campinas, SP, Brasil, tese de Doutorado.
- Moeller-Dombois, D. & Ellemberg, H., 1974. Aims and methods of vegetation ecology. John Wiley & Sons, New York, 547p.
- Moreira, F.M., Silva, M.F. & Faria, S.M., 1992. Occurrence of nodulation in legume species in the Amazon Region of Brazil. *New Phytol.* 121: 563-570.
- Morellato, P.C., 1991. Estudo da fenologia de árvores, arbustos e lianas de uma floresta semidecídua no Sudeste do Brasil. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil, tese de Doutorado.
- Morellato, P.C. & Leitão-Filho, H.F., 1995. Ecologia e preservação de uma floresta tropical urbana: Reserva de Santa Genebra. Editora da Unicamp. Campinas, SP. 136 p.
- Mori, T.E., 1981. Metabolismo do nitrogênio durante a fase do desenvolvimento reprodutivo da soja. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil, tese de Mestrado.
- Nandal, D.P., Rana, P. & Kumar, A., 1999. Growth and yield of wheat (*Triticum*

- aestivum*) under different tree spacings of *Dalbergia sissoo* based agriculture.
Indian J. Agron. 44: 256-260.
- Nobel, P.S., 1991. Physicochemical and environmental plant physiology. Academic Press, Inc. USA. 635p.
- Norman, M.J., Pearson, C.J. & Searle, P.G., 1995. The ecology of tropical food crops. Cambridge University Press, Cambridge.
- Oliveira, I.C., Brenner, F., Chiu, J., Hsieh, M.H., Kouranov, A., Lam, H.M., Shin, M.J. & Coruzzi, C., 2001. Metabolite and light regulation of metabolism in plants: lessons from the study of a single biochemical pathway. Braz. J. Med. Biol. Res. 34(5): 567-575.
- Osmond, C.B., Winter, K. & Ziegler, H., 1982. Functional significance of different pathways of CO₂ fixation in photosynthesis. IN: Physiological plant ecology II. Water relations and carbon assimilation, (O. Lange, P. Nobel, C. Osmond and H. Ziegler, eds.), N.S. Vol. 12B, Springer-Verlag. Berlin, pp. 480-547.
- Pate, J.S., 1980. Transport and partitioning of nitrogenous solutes. Ann. Rev. Plant Physiol. 31: 313-340.
- Pearcy, R.W., 1990. Sunflecks and photosynthesis in plant canopies. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 41: 421-453.
- Pennington, T. & Fernandes, E., (eds.), 1998. The Genus *Inga*: utilization. Royal Botanic Gardens, Kew.
- Peñuelas, J., Filella, I., Llusià, J., Siscart, D. & Piñol, J., 1998. Comparative field study of spring and summer leaf gas exchange and photobiology of the mediterranean trees *Quercus ilex* and *Phillyrea latifolia*. J. Exp Bot. 49: 229-238.
- Pereira, J.S., Tenhunen, J.D., Lange, O.L., Beyschlag, W., Meyer, A. & David, M.M.,

1986. Seasonal and diurnal patterns in leaf gas exchange of *Eucalyptus globulus* trees growing in Portugal. *Can J. For Res.* 16: 177-184.
- Pimentel, C., 1998. Metabolismo de carbono na agricultura tropical. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, RJ. Editora Universidade Rural. 159p.
- Pinto, J. R., Ribeiro, G.L., Benvenuti, D. & Maciel, A.A., 1997. Composição florística e estrutura da comunidade arbóreo-arbustiva de um trecho da floresta de galeria da queda d' água véu-de-noiva, Parque Nacional da Chapada dos Guimarães, MT. IN: Contribuição ao conhecimento ecológico do Cerrado - Trabalhos selecionados do 3º Congresso de Ecologia do Brasil (Brasília, 6-11/10/96), (L. Leite and C. Saito, org.), Universidade de Brasília, Brasília D.F, Brasil, pp. 12-21.
- Polhill, R.M. & Raven, P.H., 1981. Advances in legume systematic, Part 1. Royal Botanic Gardens, Kew.
- Poorter, H. & Jong, R., 1999. A comparison of specific leaf area, chemical composition and leaf construction cost of field plants from 15 habitats differing in productivity. *New Phytol.* 143: 163-176.
- Poorter, H. & Remkes, C., 1990. Leaf area ratio and net assimilation rate of 24 wild species differing in relative growth rate. *Oecologia*, 83: 553-559.
- Poorter, H., Remkes, C. & Lambers, H., 1990. Carbon and nitrogen economy of 24 wild species differing in relative growth rate. *Plant Physiol.* 94: 621-627.
- Prance, G., Rodrigues, W. & Silva, M., 1976. Inventário forestal de um hectare de mata de terra firme Km 30 da estrada Manaus – Itacoatiara. *Acta Amazonica* 6(1): 9-35.
- Ramakrishnan, P.S., Shukla, R.P. & Boojh, R., 1982. Growth strategies of trees and their application to forest management. *Curr. Sci.* 51: 448-455.
- Reglas Internacionales para Ensayos de Semillas, ISTA, 1966. Ministerio de

- Agricultura. Instituto Nacional de Semillas y Plantas de Vivero. Ciudad Universitaria. Madrid.
- Rhodes, D., Rendon, G.A. & Stewart, G.R., 1975. The control of glutamine synthetase level in *Lemna minor* L. *Planta* 125: 201-211.
- Ritcher, G., 1993. *Métabolisme des végétaux. Physiologie et biochimie.* (Trad. de Raymond, G.). Presses polytechniques et universitaires romandes. Lausanne.
- Rodrigues, R., 1995. A sucessão florestal. IN: *Ecologia e preservação de uma floresta tropical urbana: Reserva de Santa Genebra*, (P. Morellato and F. Leitão-Filho), Editora da UNICAMP. Campinas, São Paulo, pp 30-35.
- Roggy, J. C. & Prévost, M.F., 1999. Nitrogen-fixing legumes and silvigenesis in a rain forest in French Guiana: a taxonomic and ecological approach. *New Phytol.* 144: 283-94.
- Roughley, R.J. & Pulsford, D.J., 1982. Production and control of legume inoculants. IN: *Nitrogen fixation in legumes.* (J. M. Vincent, eds.). Australia, Academic Press., pp. 193-209.
- Salisbury, F.B. & Ross, C.W., 1994. *Fisiologia Vegetal.* Grupo Editorial Iberoamérica. México. 759p.
- Sanches, M., 1997. *Espécies de lianas da Reserva Municipal de Santa Genebra*, Campinas, SP.: longevidade das sementes e crescimento inicial. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil, tese de Mestrado.
- Sangakkara, R., 1994. Growth, yield and nodule activity of mungbean intercropped with maize and cassava. *J. Sci. Food Agric.* 66: 417-421.
- Sawazaki, H.E., 1986. Efeito de fonte externa de nitrogênio no transporte de compostos nitrogenados em plantas de soja *Glycine max* (L.) Merr., cultivar santa rosa.

- Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil, tese de Mestrado.
- Sharkey, T.D. & Raschke, K., 1981a. Separation and measurement of direct and indirect effects of light on stomata. *Plant. Physiol.* 68: 33-40.
- Sharkey, T.D. & Raschke, K., 1981b. Effect of light quality on stomatal opening in leaves of *Xanthium strumarium* L. *Plant. Physiol.* 68: 1170-1174.
- Schulze, E.D. & Hall, A.E., 1982. Stomatal responses, water loss and CO₂ assimilation rates of plants in contrasting environments. IN: *Physiological Plant Ecology: II Water relations and carbon assimilation.* (O.L., Lange, P.S., Nobel, C.B. Osmond, & H., Ziegler, eds.), Berlin, Springer-Verlag, pp. 181-229.
- Siddigi, M.Y. & Glass, A.D., 1981. Utilization index: a modified approach to the estimation and comparison of nutrient utilization efficiency in plants. *J. Plant Nutrition*, 4(3): 289-302.
- Silva, B. & Lemos-Filho, J., 2001. Relações hídricas em espécies lenhosas no Campus Pampulha/UFMG, Belo Horizonte, MG. *Rev. Brasil. Bot. São Paulo.* 24(4) (suplemento): 519-525.
- Silveira, J.A., Matos, J.C., Cecatto, V.M., Viegas, R.A. & Oliveira, J.T., 2001. Nitrate reductase activity, distribution, and response to nitrate in two contrasting *Phaseolus* species inoculated with *Rhizobium* spp. *Environ Exp Bot.* 46: 37-46.
- Sodek, L. & Silva, D. M., 1996. Nitrate inhibits soybean nodulation and nodule activity when applied to root regions distant from the nodulation sites. *Rev. Bras. Fisiol. Veg.* 8: 187-191.
- Souza, R.P., 1996. Germinação, crescimento, atividade fotossintética e translocação de compostos de carbono em espécies arbóreas tropicais: estudo comparativo e influência de sombreamento natural. Universidade Estadual de Campinas,

- Campinas, SP, Brasil, tese de Doutorado.
- Souza, R. P. & Válio, I.F., 2001. Seed size, seed germination, and seedling survival of Brazilian Tropical tree species differing in successional status. *Biotropica* 33(3): 447-457.
- Souza, C.R., Soares, A.M. & Regina, M.A., 2001. Trocas gasosas de mudas de videira, obtidas por dois porta-enxertos, submetidas à deficiência hídrica. *Pesq. Agrop. Bras. Brasília D.F.* 36(10): 1221-1230.
- Smirnoff, N., Todd, P. & Steward, G.R., 1984. The occurrence of nitrate reduction in the leaves of woody plants. *Ann. Botany.* 54: 363-374.
- Spiegel, M., 1972. Cálculo avançado. Editora McGraw-Hill do Brasil, Ltda. São Paulo - Rio de Janeiro, 500p.
- Sprent, J.I., 1995. Legume trees and shrub in the tropics. N₂- fixation in perspective. *Soil, Biol Biochem.* 27: 401-407.
- Sprent, J.I., 2000. Nodulation in woody legumes: our state of ignorance. *NFT News. Improvement and culture of culture of nitrogen fixing tress.* 3 (1). <http://iufro.boku.ac.at/iufro/iufronet/d2/wu2080/nftnews3.htm#nodulation>
- Sprent, J.I., 2001. Nodulation in legumes. Royal Botanic Gardens, Kew. Great Britain. 46p.
- Stewart, G.R. & Orebamjo, T.O., 1983. Studies of nitrate utilization by the dominant species of regrowth vegetation of tropical West Africa: a Nigerian example. IN: Nitrogen as an ecological factor. (J.A., Lee, S., McNeill and I.H., Rorison eds.). Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp. 167-188.
- Tajima, S., Takane, K., Noruma, M. & Kouchi, H., 2000. Symbiotic nitrogen fixation at the late stage of nodule formation in *Lotus japonicus* and other legume plants. *J.*

- Plant Res. 113: 467-473
- Taiz, L. & Zeiger, E., 1998. Plant Physiology. 2^a Edition. Sinauer Associates, Inc. Publisher. Sunderland, Massachusets. 792p.
- Tenhuen, J.D., Lange, O.L. & Braun, M., 1981. Midday stomatal closure in Mediterranean type sclerophylls under stimulated habitat conditions in a environmental chamber. II Effect on the complex of leaf temperature and air humidity on gas exchange of *Arbutus unedo* and *Quercus ilex*. Oecologia 50: 5-11.
- Tonin, G.S., 1988. Influência da fonte de nitrogênio na atividade de enzimas envolvidas no processo de assimilação de amidas e ureídeos em cotilédones imaturos de soja mantidos em cultura. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil, tese de Doutorado.
- Vincent, J.M., 1970. Manual for the practical study of root nodule bacteria. Oxford: Blackwell. 164p.
- Vogels, C.D., Van der Drift, G.D., 1970. Differential analysis of glyoxylate derivatives. Anal. Biochem. 33: 143-157.
- Wallsgrave, R.M, Keys, A.J., Lea, P.J. & Miflin, B.J., 1983. Photosynthesis, photorespiration and nitrogen metabolism. Plant Cell Environ. 6: 301-309.
- Wang, G.G., Qian, H. & Klinka, K., 1994. Growth of *Thuja plicata* seedlings along a light gradient. Can. J. Bot. 72: 1749-1757.
- Waters, M.B., Kruger, E.L. & Reich, P.B. 1993. Growth, biomass distribution and CO₂ exchange of northern hardwood seedling in high and low light: relationship with successional status and shade tolerance. Oecologia. 94: 7-16.
- Watson, D. J., 1947. Comparative physiological studies on the growth of field crops. I. Variation in net assimilation rate and leaf area between species and varieties and

- within and between years. *Ann. Bot.* 11: 41-76.
- Wong, C.C. & Stur, W.W., 1996. Persistence of tropical forage grasses in shaded environments. *J. Agric Sci.* 126: 151-159.
- Xu, D.Q. & Shen, Y.K., 1996, Midday depression of photosynthesis. IN: Handbook of photosynthesis. (M. Pessarakli, ed.), Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 451-459.
- Yamada, T., 1995. Adubação nitrogenada do milho: como melhorar a eficiência?. *Informações Agronômicas* 71: 1-3.
- Yamada, T., 1996. Adubação nitrogenada do milho: quanto, como, e quando aplicar? *Informações Agronômicas*, 74: 1-5.
- Yemm, E.W. & Cocking, E.C., 1955. Estimation of amino acids by ninhidrin. *Analyst.* 80: 209-213.
- Yoneyama, T. & Ishizuka, J., 1982. ¹⁵N study on the partitioning of the nitrogen taken by soybeans from atmospheric dinitrogen, medium nitrate or ammonium. *Soil Sci. Plant Nutr.* 28: 451-461.
- Zanella, F., 2001. Crescimento, trocas gasosas e atividade do sistema GS/GOGAT em alfafa nodulada sob tratamento com fósforo. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, MG, Brasil, tese de Mestrado.
- Zotz, G., Harris, G., Koniger, M. & Winter, K., 1995. High rates of photosynthesis in the tropical pioneer tree, *Ficus insipida* Willd. *Flora* 190: 265-272.

VII. APÊNDICE

Figura VIII.1. Registro das temperaturas médias mensais máximas e mínimas, na casa de vegetação da área experimental do Departamento de Fisiologia Vegetal, IB, durante o ano 2001.

