



**VALDELICE OLIVEIRA LACERDA**

**ALTERAÇÕES BIOMÉTRICAS, NUTRICIONAIS E  
METABÓLICAS EM PLANTAS JOVENS DE *Zeyheria  
tuberculosa* (Vell.) Bureau ex Verl SUBMETIDAS A  
DIFERENTES NÍVEIS E PROPORÇÕES DE NITRATO E  
AMÔNIO E TOXICIDADE POR ALUMÍNIO**

**LAVRAS - MG  
2025**

**VALDELICE OLIVEIRA LACERDA**

**ALTERAÇÕES BIOMÉTRICAS, NUTRICIONAIS E METABÓLICAS EM  
PLANTAS JOVENS DE *Zeyheria tuberculosa* (Vell.) Bureau ex Verl SUBMETIDAS A  
DIFERENTES NÍVEIS E PROPORÇÕES DE NITRATO E AMÔNIO E  
TOXICIDADE POR ALUMÍNIO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agronomia/Fisiologia Vegetal, área de concentração em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de Doutora.

Dr. Luiz Edson Mota de Oliveira  
Orientador

Dra. Elisa Monteze Bicalho  
Coorientadora

**LAVRAS - MG  
2025**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Lacerda, Valdelice Oliveira.

Alterações biométricas, nutricionais e metabólicas em plantas jovens de *Zeyheria tuberculosa* (Vell.) Bureau ex Verl submetidas a diferentes níveis e proporções de nitrato e amônio e toxicidade por alumínio / Valdelice Oliveira Lacerda. - 2023.

98 p. : il.

Orientador(a): Luiz Edson Mota de Oliveira.

Coorientador(a): Elisa Monteze Bicalho.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2025.

Bibliografia.

1. Adubação nitrogenada. 2. Nitrato redutase. 3. Solos ácidos.  
4. Glutamina sintetase. 5. Glutamato sintase. 6. Glutamato desidrogenase. 7. Ipê-felpudo. I. Oliveira, Luiz Edson Mota de. II. Bicalho, Elisa Monteze. III. Título.

**VALDELICE OLIVEIRA LACERDA**

**ALTERAÇÕES BIOMÉTRICAS, NUTRICIONAIS E METABÓLICAS EM  
PLANTAS JOVENS DE *Zeyheria tuberculosa* (Vell.) Bureau ex Verl SUBMETIDAS A  
DIFERENTES NÍVEIS E PROPORÇÕES DE NITRATO E AMÔNIO E  
TOXICIDADE POR ALUMÍNIO**

**BIOMETRIC, NUTRITIONAL AND METABOLIC CHANGES IN YOUNG  
PLANTS OF *Zeyheria tuberculosa* (Vell.) Bureau ex Verl SUBJECTED TO  
DIFFERENT LEVELS AND PROPORTIONS OF NITRATE AND AMMONIUM AND  
ALUMINUM TOXICITY**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Programa de Pós-graduação em Agronomia/Fisiologia Vegetal, área de concentração em Fisiologia Vegetal para obtenção de título de Doutora.

APROVADA em 28 de setembro de 2023.

Dra. Marília Mércia Lima Carvalho Carneiro - IFBA

Dr. Nelson Delú Filho - UNIS

Dr. Paulo Araquém Ramos Cairo - UESB

Dra. Elisa Monteze Bicalho - UFLA

Dr. Luiz Edson Mota de Oliveira  
Orientador

Dra. Elisa Monteze Bicalho  
Coorientadora

**LAVRAS - MG  
2025**

## EPÍGRAFE

*“Eu queria explicar que estou constantemente superestimando e subestimando a raça humana – que raramente eu simplesmente a estimo. Eu queria perguntar a ela como a mesma coisa pode ser tão feia e gloriosa, e suas palavras e histórias tão contundentes e brilhantes.”*

*(Markus Zusak)*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus por me colocar em situações desafiadoras e me fortalecer para que eu prossiga até o fim.

À minha mãe, Denizalva, por ser meu exemplo, meu Norte e a razão por eu sempre tentar ir um pouco mais longe. O seu amor me sustenta em todos os momentos.

Às minhas irmãs, Jucinalva, Rosenalva, Evilene e Evaneide, por sempre estarem ao meu lado mesmo à distância e terem, mesmo sem saber, aberto muitas portas que me trouxeram até aqui.

A todos os meus amigos, de longa data e conhecidos no decorrer dessa caminhada, por serem porto seguro em meio a tempestade. Vocês são fundamentais em minha vida.

Ao meu orientador, Prof. Luiz Edson, que me ensinou muito além de metabolismo vegetal, mas também sobre boas relações humanas e por sempre reforçar que cultivar boas amizades é tão importante quanto a produção científica.

À minha coorientadora, Profa. Elisa Bicalho, por todo suporte e por me dar o sentimento de pertencimento ao me acolher no seu grupo de pesquisa.

Ao Prof. Lucas Amaral, por ter fornecido as sementes da espécie utilizada nesse trabalho.

Aos técnicos atuais e que passaram pelo PPGFV, Joel, Tais e Salete, pelo suporte fornecido sempre com muito carinho e cuidado.

Aos professores do PPGFV por todos os ensinamentos.

Aos meus colegas contemporâneos no PPGFV, muito obrigada por toda troca e aprendizado.

Ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal/Agronomia.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro.

## RESUMO

O Brasil tem 58% de seu território ocupado por latossolo e argissolo, caracterizados por ser solos profundos, com alto intemperismo, elevada acidez, baixa disponibilidade de nutrientes, e, frequentemente, alta saturação de alumínio. Apesar de bem adaptadas a baixa disponibilidade de nutrientes, a vegetação nativa desse tipo de solo é capaz de responder positivamente à adubação, apresentando maior taxa de crescimento e acúmulo de biomassa. Estudos vêm demonstrando que algumas dessas espécies apresentam adaptações à alta disponibilidade de alumínio no solo, com estratégias de tolerância a esse metal, sendo algumas classificadas como hiperacumuladoras de alumínio. Dessa forma, é plausível considerar a importância de estudar as alterações fisiológicas e de crescimento de espécies nativas a diferentes condições nutricionais, como é o caso do nitrogênio, bem como a capacidade dessas espécies em tolerar altas concentrações de alumínio. Dessa forma, esse trabalho se propôs a avaliar as respostas de plantas jovens de *Zeyheria tuberculosa*, uma espécie nativa de Cerrado e com alto potencial de uso na recuperação de áreas degradadas, cultivadas em diferentes doses e fontes de adubação nitrogenada (nítrica e/ou amoniacal) e sob diferentes níveis de alumínio. Para isso, foram realizados dois experimentos com o propósito de: avaliar níveis adequados de nitrogênio, fornecidos exclusivamente com  $\text{NO}_3^-$ , para o desenvolvimento de mudas de *Z. tuberculosa* e; analisar a interação de diferentes proporções de alumínio sobre o metabolismo do nitrogênio em plantas jovens de *Z. tuberculosa*. Os experimentos foram montados em casa de vegetação e as mudas com cerca de 90 dias de idade foram submetidas, por mais 60 dias, aos diferentes tratamentos como mostrado a seguir: Experimento 1: diferentes concentrações de nitrogênio nítrico (2; 4; 8; 12; 16mM de  $\text{NO}_3^-$ ); Experimento 2: diferentes proporções de  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  (100/0; 75/25; 50/50; 25/75; 0/100) e concentrações de alumínio (0; 600 e 1200  $\mu\text{M}$ ). Em todos os experimentos foram feitas análises biométricas e bioquímicas em folhas e raízes das mudas. Os experimentos foram realizados em delineamento em blocos casualizado (DBC) e os dados foram submetidos à regressão e análise de variância, com médias comparadas pelo Teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade, utilizando o software R<sup>®</sup> através da plataforma RStudio. Os resultados aqui obtidos demonstram que níveis de nitrogênio acima de 10mM configuram consumo de luxo para *Z. tuberculosa* e que o metabolismo do nitrogênio, carbono e antioxidante é alterado sob baixa disponibilidade de nitrogênio. Os maiores valores de crescimento de *Z. tuberculosa* foram observados quando essa espécie foi fertilizada com fontes mistas de nitrogênio, com maior desempenho sob proporção de 50/50. Fontes mistas de nitrogênio também contribuíram para que a espécie em estudo mantivesse o funcionamento do metabolismo de carbono, nitrogênio e homeostase redox sob a presença de alumínio. Os resultados obtidos nesse trabalho são importantes para fundamentar estratégias de produção de mudas de *Z. tuberculosa* e sua introdução em ambientes naturais utilizando-se de uma adubação nitrogenada adequada com diferentes fontes de nitrogênio, inclusive podendo mitigar os efeitos do alumínio sobre o crescimento dessas plantas.

**Palavras-chave:** Adubação nitrogenada; Nitrato redutase; Solos ácidos; Glutamina sintetase; Glutamato sintase; Glutamato desidrogenase; Ipê-felpudo.

## ABSTRACT

Brazil has 58% of its territory occupied by latosol and argisol, characterized by being deep soils, with high weathering, high acidity, low availability of nutrients, and, often, high aluminum saturation. Despite being well adapted to low nutrient availability, native vegetation of this type of soil is capable of responding positively to fertilization, showing higher growth rates and biomass accumulation. Studies have demonstrated that some of these species have adaptations to deal with the high availability of aluminum in the soil, with tolerance strategies to this metal, with some options being aluminum hyperaccumulators. Therefore, it is plausible to consider the importance of studying the physiological and growth modulations of native species under different nutritional conditions, as is the case with nutrition, as well as the ability of these species to tolerate high concentrations of aluminum. Thus, this work aimed to evaluate the responses of young plants of *Zeyheria tuberculosa*, a species native to the Cerrado and with high potential for use in the recovery of degraded areas, cultivated in different doses and sources of nitrogen fertilizer (nitric and/or ammonia) and under different levels of aluminum. To this end, two experiments were carried out with the objective of: evaluating the best level of nitrogen, supplied exclusively with nitrate, for the development of *Z. tuberculosa* seedlings and; analyze the interaction of different proportions of aluminum on nitrogen metabolism in young *Z. tuberculosa* plants. The experiments were set up in a greenhouse and seedlings around 90 days old were subjected, for another 60 days, to different treatments as shown below: Experiment 1: different concentrations of nitric nitrogen (2; 4; 8; 12 and 16mM of  $\text{NO}_3^-$ ); Experiment 2: different proportions of  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  (100/0; 75/25; 50/50; 25/75; 0/100) and aluminum concentrations (0; 600 and 1200  $\mu\text{M}$ ). In all experiments, biometric and biochemical analyzes were carried out on leaves and roots of the seedlings. The experiments were carried out in a randomized block design (DBC) and the data were subjected to regression and analysis of variance, with means compared by Scott-Knott's test at 5% probability level, using the R<sup>®</sup> software through the RStudio platform. The results obtained here demonstrate that nitrogen levels above 10mM constitute luxury consumption for *Z. tuberculosa* and that nitrogen, carbon and antioxidant metabolism are altered under low nitrogen availability. The highest growth values of *Z. tuberculosa* were observed when this species was fertilized with mixed sources of nitrogen, with greater performance in a 50/50 ratio. Mixed sources of nitrogen were also developed so that the species under study could maintain the functioning of carbon, nitrogen metabolism and redox homeostasis under the presence of aluminum. The results obtained in this work are important for fundamental strategies for the production of *Z. tuberculosa* seedlings and their introduction into natural environments using adequate nitrogen fertilization with different sources of nitrogen, which can also mitigate the effects of aluminum on the growth of these plants.

**Keywords:** Nitrogen fertilizer; Nitrate reductase; Acidic soils; Glutamine synthetase; Glutamate synthase; Glutamate dehydrogenase; Ipe-felpudo.



## INDICADORES DE IMPACTO

A pesquisa sobre o impacto do alumínio no metabolismo do nitrogênio em *Zeyheria tuberculosa* oferece contribuições ambientais, sociais e econômicas importantes. Ambientalmente, o estudo revela como plantas nativas interagem com o alumínio em solos ácidos, prejudiciais a muitas espécies vegetais. A capacidade de *Z. tuberculosa* tolerar e, potencialmente, acumular alumínio sugere estratégias de uso de plantas nativas para reduzir esse metal em solos, promovendo a recuperação de áreas degradadas e a restauração de ecossistemas, melhorando a qualidade do solo e a biodiversidade. Socialmente, as descobertas desse estudo beneficiam populações locais em áreas rurais e agrícolas enfrentando degradação e problemas de fertilidade do solo. O uso de *Z. tuberculosa* no reflorestamento pode melhorar a qualidade de vida dessas comunidades, criando ambientes mais saudáveis e produtivos e conservando recursos naturais e serviços ecossistêmicos como controle da erosão, armazenamento de carbono e preservação da biodiversidade. Economicamente, a pesquisa pode reduzir os custos de recuperação de terras e aumentar a produtividade agrícola em regiões afetadas por solos ácidos, com alta disponibilidade de alumínio e baixa disponibilidade de nutrientes como o nitrogênio. Precisa-se destacar que os dados obtidos sobre a influência positiva do alumínio sobre a enzima GOGAT é uma contribuição inédita e relevante para a ciência, uma vez que nenhum estudo prévio demonstrou essa interação direta. Isso abre novas perspectivas para pesquisas focadas nessa interação específica. Além disso, insights sobre o manejo de nutrientes e adubação podem melhorar as práticas agrícolas, otimizando o uso de recursos e reduzindo custos com fertilizantes. O desenvolvimento de tecnologias para recuperação e melhoramento do solo pode abrir novas possibilidades para a agricultura sustentável, impulsionando a economia local e regional de maneira equilibrada e ecologicamente responsável. A pesquisa, portanto, avança o conhecimento científico e se conecta a soluções práticas para problemas ambientais e socioeconômicos, com potencial de melhorar tanto a qualidade ambiental quanto a qualidade social das comunidades por ela alcançadas.

## IMPACT INDICATORS

Research on the effects of aluminum on nitrogen metabolism in *Zeyheria tuberculosa* provides valuable contributions to environmental, social, and economic domains. From an environmental perspective, the study elucidates the interaction between native plants and aluminum in acidic soils, which are harmful to many plant species. The ability of *Z. tuberculosa* to tolerate and potentially accumulate aluminum offers promising strategies for utilizing native plants to mitigate aluminum contamination in soils. This could aid in the rehabilitation of degraded areas, restoration of ecosystems, enhancement of soil quality, and preservation of biodiversity. Socially, the findings of this research hold significance for rural and agricultural communities that face soil degradation and fertility challenges. The implementation of *Z. tuberculosa* in reforestation initiatives can improve the living conditions of these communities by fostering healthier and more productive environments. Furthermore, it can contribute to the conservation of natural resources and ecosystem services, such as erosion control, carbon sequestration, and biodiversity preservation. Economically, this research may lead to a reduction in the costs of land reclamation and an increase in agricultural productivity in regions affected by acidic soils with high aluminum content and nutrient deficiencies, particularly nitrogen. It is also noteworthy that the discovery of aluminum's positive influence on the GOGAT enzyme represents a novel and significant contribution to scientific knowledge, as no prior studies have demonstrated this direct interaction. This finding opens new avenues for research focused on this specific biochemical relationship. Additionally, insights into nutrient management and fertilization practices derived from this research have the potential to enhance agricultural practices by optimizing resource utilization and reducing fertilizer expenses. The development of technologies for soil restoration and improvement may provide new opportunities for sustainable agriculture, fostering economic growth in a manner that is both ecologically balanced and socially responsible. In conclusion, this research not only advances scientific understanding but also presents practical solutions to environmental and socio-economic challenges, offering the potential to improve both the environmental sustainability and social well-being of affected communities.

## SUMÁRIO

|                                                                                                                                                                                                            |           |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. INTRODUÇÃO .....</b>                                                                                                                                                                                 | <b>10</b> |
| <b>2. REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>                                                                                                                                                                        | <b>12</b> |
| 2.1 Metabolismo do nitrogênio .....                                                                                                                                                                        | 12        |
| 2.2 Alumínio no sistema solo-plantas .....                                                                                                                                                                 | 15        |
| 2.3 Interação entre nitrogênio e alumínio em plantas .....                                                                                                                                                 | 17        |
| 2.4 <i>Zeyheria tuberculosa</i> .....                                                                                                                                                                      | 19        |
| <b>3. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>                                                                                                                                                                         | <b>21</b> |
| 3.1 Obtenção de sementes e produção de mudas.....                                                                                                                                                          | 21        |
| 3.2 Experimento 1: Efeito de diferentes concentrações de nitrogênio nítrico sobre o crescimento inicial e nos metabolismos do nitrogênio, carbono e antioxidante em <i>Z. tuberculosa</i> .....            | 23        |
| 3.2.1 Preparo de soluções nutritivas .....                                                                                                                                                                 | 23        |
| 3.2.2 Análises biométricas .....                                                                                                                                                                           | 24        |
| 3.2.3 Quantificação de nitrogênio total.....                                                                                                                                                               | 25        |
| 3.2.4 Extração e quantificação de aminoácidos e proteínas totais.....                                                                                                                                      | 25        |
| 3.2.5 Enzimas envolvidas no metabolismo do nitrogênio .....                                                                                                                                                | 25        |
| 3.2.6 Determinação dos teores de pigmentos fotossintéticos .....                                                                                                                                           | 27        |
| 3.2.7 Avaliação de parâmetros fotossintéticos .....                                                                                                                                                        | 27        |
| 3.2.8 Quantificação de carboidratos solúveis e amido.....                                                                                                                                                  | 27        |
| 3.2.9 Sistema antioxidante .....                                                                                                                                                                           | 28        |
| 3.2.10 Análise estatística.....                                                                                                                                                                            | 29        |
| 3.3 Experimento 2: Influência do alumínio e diferentes proporções de nitrato e amônio no desenvolvimento inicial e nos metabolismos do nitrogênio, do carbono, antioxidante em <i>Z. tuberculosa</i> ..... | 30        |
| 3.3.1 Implementação do experimento 2 .....                                                                                                                                                                 | 30        |
| 3.3.2 Quantificação de fósforo (P) e alumínio (Al) .....                                                                                                                                                   | 32        |
| 3.3.3 Quantificação de nitrato e amônio .....                                                                                                                                                              | 32        |
| 3.3.4 Quantificação de prolina .....                                                                                                                                                                       | 33        |
| 3.3.5 Avaliação da peroxidação lipídica .....                                                                                                                                                              | 33        |
| 3.3.6 Análise estatística.....                                                                                                                                                                             | 33        |

|                                                                                                                                                                                             |           |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>4. RESULTADOS .....</b>                                                                                                                                                                  | <b>34</b> |
| 4.1 Efeito de diferentes concentrações de nitrogênio sobre o crescimento inicial e nos metabolismos do nitrogênio, carbono e antioxidante em <i>Z. tuberculosa</i> ..                       | 34        |
| 4.2 Influência do alumínio e diferentes proporções de nitrato e amônio no desenvolvimento inicial e nos metabolismos do nitrogênio, do carbono, antioxidante em <i>Z. tuberculosa</i> ..... | 44        |
| <b>5. DISCUSSÃO .....</b>                                                                                                                                                                   | <b>64</b> |
| <b>6. CONCLUSÃO.....</b>                                                                                                                                                                    | <b>75</b> |
| <b>7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>                                                                                                                                                         | <b>77</b> |
| <b>REFERÊNCIAS.....</b>                                                                                                                                                                     | <b>79</b> |
| <b>APÊNDICE .....</b>                                                                                                                                                                       | <b>96</b> |

## 1. INTRODUÇÃO

A relação entre a qualidade do solo e a elevada diversidade vegetal ainda é um tema controverso. Enquanto alguns pesquisadores atrelam a abundância de espécies de uma região a solos intemperizados, com baixa disponibilidade de nutrientes (LALIBERTÉ *et al.* 2013; RODRIGUES *et al.*, 2018), outros defendem que a riqueza de espécies vegetais está mais associada a solos férteis (LIU *et al.*, 2021; SADEGHINIA.; KARGAR; DE LA RIVA, 2023). Todavia, quando se trata de áreas degradadas, o solo geralmente se encontra em avançado estado de desequilíbrio (ZHANG *et al.*, 2019b). Havendo assim, uma necessidade de acelerar o processo de revegetação por meio de adubação, e retornando, dentro do que é possível, às condições ideais daquele ambiente (JAQUETTI *et al.*, 2021; JAQUETTI *et al.*, 2022). A rápida retomada da vegetação e seu estabelecimento no ambiente favorece a chegada de novas espécies e o aumento da diversidade vegetal que, por sua vez, pode favorecer o aumento do status nutricional naquele ambiente (DYBZINSKI *et al.*, 2008; SCHMIDT; VELDKAMP; CORRE, 2015; HEYDARI *et al.*, 2020).

Processos metabólicos como absorção e assimilação de nitrogênio são fundamentais para o estabelecimento e crescimento de uma planta no ambiente (WANG *et al.* 2020; VIEIRA *et al.*, 2021). O metabolismo do nitrogênio está intimamente relacionado ao metabolismo do carbono e ambos são essenciais para o crescimento e desenvolvimento das plantas. A limitação de nitrogênio pode afetar o acúmulo de biomassa nas plantas, mesmo quando essas estão expostas a elevadas concentrações de CO<sub>2</sub> (REICH *et al.*, 2006; REICH e HOBBIE, 2013). Nota-se na literatura que, em espécies de sistemas naturais, ainda é comum a carência de informações básicas sobre os metabolismos do nitrogênio e carbono e suas relações nas folhas e nas raízes, bem como as formas de transporte dos compostos nitrogenados assimilados nestes órgãos.

Diferentes espécies vegetais apresentam preferência diferencial na forma de nitrogênio absorvida, todavia a maioria das espécies absorvem e assimilam melhor o nitrogênio na forma de nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) (CHEN *et al.*, 2020; YANG *et al.*, 2022; DUAN *et al.*, 2023). Espécies que absorvem o nitrogênio na forma do amônio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) podem levar à acidificação do solo pela liberação de íons H<sup>+</sup> durante o transporte do NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (ESTEBAN *et al.*, 2016). Enquanto, espécies que absorvem NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, além de transportar íons H<sup>+</sup> para dentro da planta, também leva a liberação de íons OH<sup>-</sup> para a rizosfera, elevando seu o pH (NEINA, 2019).

A via de redução de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> a NH<sub>4</sub><sup>+</sup> é catalisada pelas enzimas nitrato redutase (NR, EC 1.6.6.1) e nitrito redutase (NiR, EC 1.7.7.1) no citosol e plastídios, respectivamente (DANIEL-

VEDELE; KRAPP e KAISER, 2010). A metabolização do  $\text{NH}_4^+$  em aminoácidos é realizada, principalmente, pelas enzimas glutamina sintetase (GS, EC 6.3.1.2) e glutamato sintase (GOGAT, EC 1.4.7.1) (MASCLAUX-DAUBRESSE *et al.*, 2010). A atividade das enzimas envolvidas no metabolismo do nitrogênio pode sofrer influências de diversos fatores intrínsecos (espécie e idade da planta), quanto extrínseco (estresses biótico e abiótico) (ALT; DOYLE e MALLADI, 2017; ASHRAF *et al.*, 2018). A forma de nitrogênio que é absorvida pela planta tem papel fundamental na atividade das enzimas responsáveis por metabolizar esse nutriente (YAO *et al.*, 2011).

As alterações do pH do solo em decorrência da fertilização com nitrogênio podem variar de acordo com os tipos de ecossistema, taxa de adição de nitrogênio, quais fontes de nitrogênio são utilizadas e duração de exposição (TIAN e NIU, 2015). Ainda no contexto de baixo pH do solo, outro fator que influencia no estabelecimento de plantas em solos ácidos é a disponibilidade de alumínio. Esse elemento é o metal mais abundante e o terceiro elemento mais abundante na crosta terrestre, porém sua disponibilidade para as plantas está associada à acidez do solo (YANG *et al.*, 2015a; BOJÓRQUEZ-QUINTAL *et al.*, 2017). Muitas plantas, em especial as de florestas boreais e tropicais, apresentam mecanismos de resistência a esse metal, seja por tolerância ou exclusão (BRUNNER e SPERISEN, 2013). Algumas espécies, por serem adaptadas à presença desse elemento no solo, necessita dele para que seu metabolismo primário funcione corretamente (KAUR *et al.*, 2015; SUN *et al.*, 2020; KAUR *et al.*, 2023). Todavia, ainda são necessários mais estudos para compreender melhor como, de fato, esses mecanismos funcionam.

Nesse contexto, espécies tropicais, a exemplo de *Zeyheria tuberculosa* (Vell.) Bureau ex Verl (Bignoniaceae), são objeto de estudo interessantes, uma vez que, apresentam características ruderais, se desenvolvendo com facilidade em solos degradados (MARTINELLI; MORAES, 2013). Além de se tratar de uma espécie com potencial para ser utilizada em recuperação de áreas, a sua madeira é muito utilizada na construção civil e alguns estudos têm demonstrado o potencial farmacológico dessa espécie atuando como cicatrizante e antibacteriano (MARTINELLI; MORAES, 2013; SARMENTO *et al.*, 2014; SILVA *et al.*, 2015). Contudo, estudos visando compreender processos relacionadas à nutrição de *Z. tuberculosa* ainda são inexistentes.

Dessa forma, esse trabalho possui relevância para a fundamentação teórica sobre a vegetação nativa do Brasil, uma vez que visa gerar informações sobre a nutrição e tolerância ao alumínio em uma espécie nativa ainda pouco estudada do ponto de vista da sua fisiologia, nutrição e metabolismo mineral. Buscou-se também esclarecer como a adubação nitrogenada

pode atuar no desenvolvimento inicial de *Z. tuberculosa* e como a interação entre diferentes fontes de nitrogênio e o alumínio pode afetar o crescimento dessa espécie. Compreender esses processos é importante para traçar estratégias mais eficientes para a recuperação da vegetação, que vem aumentando gradativamente, visando mitigar os danos causados por todas as atividades antrópicas que geram perda na cobertura vegetal nativa e alterações nas características edafoclimáticas nos diferentes ambientes naturais.

Sendo assim, esse trabalho propôs caracterizar os processos enzimáticos de assimilação do nitrato e amônio em plantas jovens de *Z. tuberculosa* cultivadas em diferentes concentrações e fontes de nitrogênio (nítica e/ou amoniacal) e sob diferentes níveis de alumínio, bem como os efeitos desses processos sobre a síntese de carboidratos e o sistema antioxidante dessa espécie. Assim, buscando elucidar o padrão de funcionamento das enzimas envolvidas na assimilação do nitrogênio nessa espécie, bem como esclarecer como o alumínio disponível na rizosfera pode afetar a ação dessas enzimas.

## **2. REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1 Metabolismo do nitrogênio**

O nitrogênio é um dos mais importantes nutrientes para o crescimento e reprodução das plantas, sendo absorvido, principalmente, na sua forma nítica ( $\text{NO}_3^-$ ) e amoniacal ( $\text{NH}_4^+$ ). Todavia, o  $\text{N}_2$  é a principal forma do nitrogênio presente na biosfera, necessitando ser fixado em nitrogênio amoniacal, através da ação da nitrogenase, para posterior absorção pelas plantas (HOFFMAN *et al.*, 2014). O  $\text{NH}_4^+$  produzido nesse processo pode ser oxidado a hidroxilamina, nitrito e nitrato pelo processo de nitrificação, realizado por bactérias oxidantes de amônio e bactérias oxidantes de nitrito (HAYATSU; KANAKO; SAITO, 2008). Todavia, a raiz pode liberar exsudados influenciando o potencial redox e alterando a atividade e densidade das populações microbianas na rizosfera que, por sua vez podem interconverter as formas de nitrogênio do solo, incluindo aquelas derivadas de fertilizantes (XU; FAN; MILLER, 2012).

Além da fixação do  $\text{N}_2$  e da oxidação do  $\text{NH}_4^+$ , há também um processo denominado desnitrificação, onde o nitrato é convertido a nitrito, óxido nítrico, óxido nitroso, chegando novamente ao  $\text{N}_2$ . Essas reações ocorrem mediante a ação de bactérias e fungos presente no solo (HAYATSU; KANAKO; SAITO, 2008). Sabe-se que exsudados das raízes podem melhorar a eficiência da utilização do nitrogênio influenciando o potencial redox e alterando a atividade e densidade das populações microbianas na rizosfera que, por sua vez podem interconverter as formas de nitrogênio do solo, incluindo aquelas derivadas de fertilizantes (XU; FAN; MILLER, 2012). Tal dinâmica torna fundamental estudos que busquem reproduzir as

variações das fontes nitrogenadas no solo e seus impactos na absorção e otimização de nitrogênio pelas plantas. É imperativo investigar os efeitos dessas dinâmicas sobre a absorção e translocação de elementos poluentes pelas plantas.

Quanto à absorção do nitrogênio mineral, as plantas possuem transportadores específicos que regulam a captação desse elemento. A captação de  $\text{NO}_3^-$  do solo é mediada por transportadores de nitrato de baixa afinidade (NRT1 - sistemas de baixa afinidade) e alta afinidade (NRT2 - sistemas de alta afinidade) (FAN *et al.*, 2017). Enquanto que, para o transporte e homeostase de  $\text{NH}_4^+$  nas plantas, existem os sistemas saturáveis de alta afinidade (transportadores de amônio – AMTs) e os não saturáveis de baixa afinidade (aquaporinas ou canais de cátions) (BERTL e KALDENHOFF, 2007, PANTOJA, 2012, KIRSCHT *et al.*, 2016). Além da absorção de nitrogênio inorgânico, folhas senescentes também se tornam importantes fontes de nitrogênio, reciclando esse nutriente e o realocando para outros órgãos das plantas. Raízes e folhas em desenvolvimento são os principais drenos de nitrogênio durante a fase vegetativa, enquanto na fase reprodutiva, as flores, frutos e sementes são os principais drenos do nitrogênio assimilado (WHITE *et al.*, 2016).

As enzimas envolvidas na assimilação do  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4^+$  atuam de diferentes formas a depender da planta e das condições do ambiente. A redução do  $\text{NO}_3^-$  pela atividade da nitrato redutase (NR) no citoplasma das células vegetais pode acontecer nas folhas, raízes ou nesses dois órgãos das plantas (YONEYAMA; SUZUKI 2019). Já a incorporação do  $\text{NH}_4^+$  a aminoácidos pela glutamina sintetase (GS) pode ocorrer no citoplasma, cloroplastos e mitocôndrias das células vegetais a depender da origem do  $\text{NH}_4^+$ , estágio de desenvolvimento e condições ambientais a que a planta se encontra (MASAKAZU T. *et al.*, 2004; LINKA; WEBER, 2005; SINGH; GHOSH, 2013).

Juntamente a GS, a Glutamato sintase (GOGAT) compõe o ciclo GS-GOGAT atuando nos cloroplastos em tecidos fotossintetizantes ou em plastídios em tecidos não fotossintetizantes, transferindo o agrupamento amina da glutamina produzida pela GS para uma molécula de  $\alpha$ -cetoglutarato formando assim duas moléculas de glutamato (MASCLAUX-DAUBRESSE *et al.*, 2010). Também é sugerido que a GOGAT dependente de Ferredoxina, assim como a glutamina sintetase cloroplastídica ( $\text{GS}_2$ ), é direcionada duplamente para os cloroplastos e mitocôndrias (JAMAI *et al.*, 2009). Outra importante enzima envolvida na assimilação do nitrogênio, principalmente quando a planta está exposta a condições de estresse, é a glutamato desidrogenase (GDH, EC 1.4.1.2), presente em cloroplastos, mitocôndrias e citoplasma. Essa enzima atua principalmente na via de desaminação do glutamato. Porém, sob



altas concentrações de  $\text{NH}_4^+$ , essa enzima pode atuar incorporando o  $\text{NH}_4^+$  livre diretamente ao  $\alpha$ -cetoglutarato, produzindo glutamato (ZHI *et al.*, 2020).

Embora muito tenha se pesquisado sobre a relação do  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4^+$  na nutrição de plantas, os resultados obtidos se diferenciam muito a depender da espécie, idade da planta, órgão de interesse, concentrações de  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4^+$  utilizadas e condições ambientais (YAO *et al.*, 2011; BRITTO e KRONZUCKER, 2013; ARNOLD; SAJITZ-HERMSTEIN e NIKOLOSKI, 2015; ZHANG *et al.*, 2018a; ZHANG *et al.*, 2018b). Estudos mostram que plantas adaptadas a solos ácidos apresentam uma maior facilidade em absorver  $\text{NH}_4^+$  quando comparadas às demais plantas (HAWKINS e ROBBINS, 2010; WANG *et al.*, 2016). Além disso, a forma adequada de nitrogênio pode amenizar efeitos deletérios provocadas por estresse abiótico (CARVALHO, 2015). Ademais, a forma de nitrogênio absorvida pode modular o perfil metabólico da planta, alterando principalmente os teores de carboidratos e compostos nitrogenados por meio da modificação na atividade das enzimas envolvidas na síntese desses metabolitos (YIN *et al.*, 2020).

Conhecer a razão adequada  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  no fornecimento de nitrogênio, além de atuar na tolerância da planta à intemperes ambientais, também é um importante aspecto para a regulação do metabolismo de carboidratos (SKŁODOWSKA *et al.*, 2015; YANG *et al.*, 2015, CARVALHO *et al.*, 2018). O metabolismo de carboidratos e sua conexão com a absorção e metabolismo de nitrogênio também é um importante fator na resposta da planta a mudanças ambientais. Em *Dipteryx alata* Vog. exposta a baixa disponibilidade hídrica, o metabolismo do nitrogênio juntamente com o metabolismo do carbono foi modificado levando ao aumento de aminoácidos e promovendo o equilíbrio no metabolismo C/N, bem como a manutenção da homeostase energética dessa espécie, melhorando seu desempenho para lidar com o déficit hídrico (VIEIRA *et al.*, 2021).

Em condições ambientais ideais, o fornecimento de  $\text{NH}_4^+$  pode elevar a fotorrespiração de planta  $\text{C}_3$ , diminuindo a assimilação de carbono (CARNEIRO, 2014). Todavia, sob condições ambientais adversas, como elevada concentração de  $\text{CO}_2$  atmosférico, o fornecimento de  $\text{NH}_4^+$  eleva a concentração de  $\text{CO}_2$  intercelular e cloroplastídica, aumentando o fluxo de elétrons para a fotossíntese, reduzindo a fotorrespiração e aliviando a inibição da fotossíntese (WANG *et al.*, 2020). Em *Arabidopsis* submetida a diferentes fontes de nitrogênio e exposta a contaminação por cádmio, a translocação desse metal foi diminuída significativamente em plantas nutridas com  $\text{NH}_4^+$  como única fonte de nitrogênio, levando-se a considerar a fertilização com nitrogênio como estratégia para diminuir os riscos do cádmio à saúde humana (VAZQUEZ *et al.*, 2020).

O *status* de nitrogênio adequado na planta favorece seus demais processos metabólicos, sendo fundamental para a síntese de proteínas, pigmentos fotossintéticos, ácidos nucleicos, aminoácidos, dentre outros (SCHULZE *et al.*, 2019). Todavia, um fornecimento desbalanceado de nitrogênio no ambiente pode gerar danos ambientais, como desbalanço nutricional (HUANG; ZHOU; LIU, 2012), eutrofização dos corpos d'água (GAO; ZHANG, 2010; SAVCI, 2012) e acidificação do solo (YANG *et al.*, 2018; HAO *et al.*, 2020).

Uma grande parcela dos estudos que visam compreender os processos envolvidos na absorção de nitrogênio é voltada, principalmente, para plantas cultivadas com valor econômico (ALT *et al.*, 2017; DIER *et al.*, 2018; RAVAZZOLO *et al.*, 2020; YIN *et al.*, 2020). Porém, podemos perceber que a variação nas fontes de nitrogênio utilizadas na nutrição das plantas pode atuar no melhor aproveitamento desse nutriente e diminuir custos na adubação.

## **2.2 Alumínio no sistema solo-plantas**

O alumínio é o terceiro elemento mais abundante na crosta terrestre e, dentre os metais, ele se encontra em maior quantidade (BOJÓRQUEZ-QUINTAL *et al.*, 2017). Apesar das altas concentrações de alumínio no solo, esse elemento não é essencial para as plantas e sua disponibilidade depende do pH do solo, se tornando mais disponível quando em pH ácido (YANG *et al.*, 2015a). É importante ressaltar que 30% de todo o solo do planeta apresenta elevada acidez, sendo, portanto, caracterizado pela deficiência de nutrientes e por toxicidade por alumínio e outros metais (UEXKÜLL e MUTERT, 1995). Solos ácidos estão localizados, principalmente, nas regiões boreais e trópicos úmidos. No entanto, a biodiversidade e a alta produção de biomassa das florestas localizadas nessas regiões (Florestas tropicais e boreais) (MOTAVALLI *et al.*, 1995; ZINKO *et al.*, 2006) indicam que suas plantas não são afetadas pela toxicidade por alumínio.

Muitas espécies de plantas são nativas de solos ácidos com alta disponibilidade de alumínio e desenvolveram adaptações para sobreviver na presença desse metal. São conhecidas duas principais formas que as plantas utilizam para lidar com o alumínio disponível no solo, a exclusão e a tolerância (BRUNNER e SPERISEN, 2013). Plantas que utilizam a via de exclusão do alumínio possuem diversos mecanismos que evitam a entrada desse metal no simplasto da planta. Ao passo que, plantas que são classificadas como tolerantes ao alumínio, apresentam mecanismos que permitem à planta lidar com esse metal já no simplasto, sem sofrer grandes danos no seu crescimento e produção (WEI *et al.*, 2021).

Os mecanismos de exclusão dependem da liberação de ligantes que quelam e desintoxicam o alumínio externamente ou limitam sua captação no citosol (YANG *et al.*, 2019).

Alguns ácidos orgânicos como citrato, oxalato e malato atuam como quelantes do alumínio, sendo exsudados pelas raízes das plantas e formando complexos estáveis não tóxicos com o alumínio presente na rizosfera (CHEN *et al.*, 2010; YANG *et al.*, 2013). Algumas plantas também agem aumentando o pH da rizosfera através do influxo de  $H^+$ , levando a diminuição das formas de alumínio disponíveis ao redor da raiz (QING *et al.*, 2018). Uma outra forma de exclusão do alumínio que vem sendo pesquisado é por meio da metilação da pectina, uma vez que espécies resistentes à presença do alumínio apresentam um maior grau de metilação da pectina, impedindo sua ligação ao alumínio na forma  $Al^{3+}$  (SCHMOHL *et al.*, 2000; SUN *et al.*, 2016).

Já as vias de tolerância ao alumínio incluem aquelas que quelam o  $Al^{3+}$  no simplasto das células da raiz, com subsequente transporte e sequestro em partes menos sensíveis da planta e compartimentos subcelulares (MA *et al.*, 1997; CHEN *et al.*, 2015). Os ácidos orgânicos, juntamente com compostos fenólicos, também são fatores importantes nessa via de tolerância ao alumínio, uma vez que essas moléculas se ligam ao alumínio presente no citosol, formando complexos menos tóxicos que são transportados pelo corpo da planta e armazenados em compartimentos menos susceptíveis à toxicidade por esse metal (ZHANG *et al.*, 2016; FU *et al.*, 2020). Outra forma que as plantas utilizam para tolerar a presença do alumínio é a ativação de vias metabólicas, como o metabolismo antioxidante, para superar os efeitos tóxicos desse metal sobre o metabolismo primário da planta (GUO *et al.*, 2018; YU *et al.*, 2019). Além disso, diversas plantas de regiões tropicais apresentam a característica de absorver e armazenar altas concentrações de alumínio na parte aérea, sendo classificadas como hiperacumuladoras de alumínio quando apresentam teores desse metal superior a  $1000 \text{ mg} \cdot \text{Kg}^{-1}$  de massa seca (CHEN *et al.*, 2008; SOUZA *et al.*, 2015).

Uma vez que a planta não apresenta os mecanismos necessários para excluir ou tolerar o alumínio, ocorrem sérios danos na sua estrutura e metabolismo (DE ALMEIDA *et al.*, 2015; BRESSAN *et al.*, 2020). Os mecanismos de toxicidade por alumínio envolvem danos na parede e na membrana celular, por meio da modificação de suas estruturas. Tais modificações leva a perturbação no transporte de íons e desequilíbrio nutricional na planta (ZHANG *et al.*, 2017). O alumínio no interior da planta aumenta a rigidez da parede celular através da reticulação de pectinas e reduz a replicação do DNA devido ao aumento da rigidez da dupla hélice (BLAMEY, 2001). Plantas sensíveis ao alumínio apresentam diminuição no crescimento de suas raízes decorrente da interferência na divisão celular na região apical da raiz principal e lateral (JASKOWIAK *et al.*, 2018; ZHANG *et al.*, 2018c).

Alguns estudos têm demonstrado que, a depender das concentrações de alumínio utilizadas, esse metal pode atuar como um fator benéfico sobre o crescimento, defesa e metabolismo das plantas (BOJÓRQUEZ-QUINTAL *et al.*, 2017). O alumínio também pode induzir a expressão ou atividade de proteínas de transporte, alterando o potencial de membrana e o fluxo de prótons que promove os fluxos de nutrientes nas plantas (ZHANG *et al.*, 2017). Outra ação benéfica do alumínio sobre as plantas é como possível fator de proteção da planta contra patógenos, gerando um acúmulo de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) que ativa a resposta sistêmica adquirida em função do ácido salicílico e do óxido nítrico (ARASIMOWICZ-JELONEK *et al.*, 2014).

Os estudos visando esclarecer os efeitos do alumínio sobre o crescimento e metabolismo de espécies nativas adaptadas a solos ricos em alumínio ainda são incipientes. Há também que se destacar que ações antrópicas como emissões industriais (NAIK *et al.*, 2002), emissões veiculares (FORNARO e GUTZ, 2003), queima de biomassa (COELHO *et al.*, 2011), emissões de usinas termelétricas (MIGLIAVACCA *et al.*, 2004) dentre outras, podem atuar no aumento da acidez do solo, que conseqüentemente pode levar a maior disponibilidade de alumínio, expondo a vegetação nativa a condições extremas que excedem seus mecanismos de tolerância.

### 2.3 Interação entre nitrogênio e alumínio em plantas

A presença de altas concentrações de alumínio no solo pode alterar diversos processos fisiológicos, celulares, moleculares e morfológicos das plantas (SINGH *et al.*, 2017). Uma dessas alterações está na forma preferencial de absorção de nitrogênio pelas plantas, uma vez que, geralmente, plantas adaptadas a solos ácidos e com elevado teor de alumínio disponível tendem a absorver melhor o  $NH_4^+$ , enquanto que, plantas de solos mais alcalinos absorvem melhor o  $NO_3^-$  (MCCAIN e DAVIES, 1983; TAYLOR e FOY, 1985; ZHAO *et al.*, 2013). Para além disso, a presença de alumínio no meio parece modular a fonte preferencial de nitrogênio pelas plantas, fazendo com que plantas que antes absorviam maiores teores de  $NO_3^-$  passem a absorver maiores teores de  $NH_4^+$  (BURNHAM *et al.*, 2017).

Estudos tem demonstrado que a presença do alumínio na rizosfera inibe a absorção de  $NO_3^-$  e isso pode estar relacionado a inibição na atividade de transportadores específicos do  $NO_3^-$  (DURIEUX *et al.*, 1993; BURNHAM *et al.*, 2017). Todavia, Rufty *et al.* (1995) observaram que o efeito do alumínio sobre a absorção do  $NO_3^-$  é dependente da concentração desse metal a qual a planta foi exposta, havendo aumento da absorção de  $NO_3^-$  sob baixas concentrações do alumínio e decréscimo na absorção sob altas concentrações.

Uma gama de trabalhos vem demonstrando as mais diversas interações do alumínio sobre a absorção do  $\text{NH}_4^+$  (HAI *et al.*, 1989; FLEMING, 1983; MORITA *et al.*, 1998; PAL'OVE-BALANG; MISTRÍK, 2007; PAL'OVE-BALANG; ZELINOVA, 2013). De forma geral, a interação negativa do alumínio sobre a absorção do  $\text{NH}_4^+$  é menor do que a exercida sobre a absorção do  $\text{NO}_3^-$  e, acredita-se que essa diminuição na absorção do  $\text{NH}_4^+$  ocorra devido a um aumento no potencial elétrico positivo da superfície das células nas raízes (ZHAO; SHEN, 2018).

As diferentes fontes de nitrogênio podem atuar como mitigadoras do estresse causado pelo alumínio em plantas. Por exemplo, o  $\text{NO}_3^-$  pode agir como regulador na resistência de plantas ao alumínio por meio elevação da síntese e exsudação de citrato pelas raízes, atuando na exclusão do alumínio do simplasto das células (WANG *et al.*, 2023). Uma outra via possível do  $\text{NO}_3^-$  atuar na resistência de plantas ao alumínio é através da alcalinização da rizosfera durante a sua absorção pela raiz, tornando o alumínio menos disponível para a planta (FANG *et al.*, 2016).

Apesar dos estudos apontando o efeito mitigador do  $\text{NO}_3^-$  sobre os danos causados pelo alumínio em plantas, diversos estudos têm demonstrado que a tolerância de plantas a esse metal está intrinsecamente relacionada a nutrição amoniacal (RORISON, 1985; OSAKI; WATANABE; TADANO, 1998; ANTUNES; NUNES, 2008; ZHAO *et al.*, 2013; ZHAO; SHEN, 2013). E que essa tolerância pode ser resultado da síntese de compostos oriundos do metabolismo do nitrogênio (ZHAO; SHEN, 2013). O fornecimento de  $\text{NH}_4^+$  ainda pode aumentar a tolerância das plantas ao alumínio devido a menor adsorção desse metal na parede celular de raízes devido sua competição com o  $\text{NH}_4^+$  (ZHAO; SHEN; SUN, 2009; CHEN *et al.*, 2010).

O alumínio pode afetar também a atividade das enzimas que assimilam o nitrogênio nas plantas. O efeito desse metal sobre a atividade da NR parece ser indireto e mais relacionado a absorção do  $\text{NO}_3^-$ . O alumínio ao afetar negativamente a absorção do  $\text{NO}_3^-$  faz com que, a baixa disponibilidade de substrato leve a menor atividade da NR (RUFTY *et al.*, 1995). Uma vez que, menor disponibilidade de  $\text{NO}_3^-$  no interior das células vegetais pode inibir a transcrição do gene da NR, bem como desestabilizar os mRNAs da mesma (FERRARIO *et al.*, 1995). Entretanto, Cambraia *et al.* (1989) observou que o alumínio adicionado à solução nutritiva ou à mistura reacional inibiu diretamente a atividade de NR de forma diferencial entre folha e raiz de sorgo.

A atividade da GS é negativamente afetada pelo alumínio em diversas espécies vegetais (PURCINO *et al.*, 2003; BALESTRASSE; GALLEGGO; TOMARO, 2006; MISHRA; DUBEY,

2011; PAL'OVE-BALANG; MISTRÍK, 2011). Todavia, alguns estudos têm demonstrado que, o alumínio quando complexado ao ácido nitrilotriacético também pode atuar como um ativador da GS em plantas, agindo de forma semelhante ao magnésio, porém, sem o substituir (KERTÉSZ *et al.*, 2002; PÉCSVÁRADI *et al.*, 2009). Esses dados podem indicar que o alumínio quando complexado com compostos orgânicos pode atuar positivamente sobre a atividade da GS em plantas.

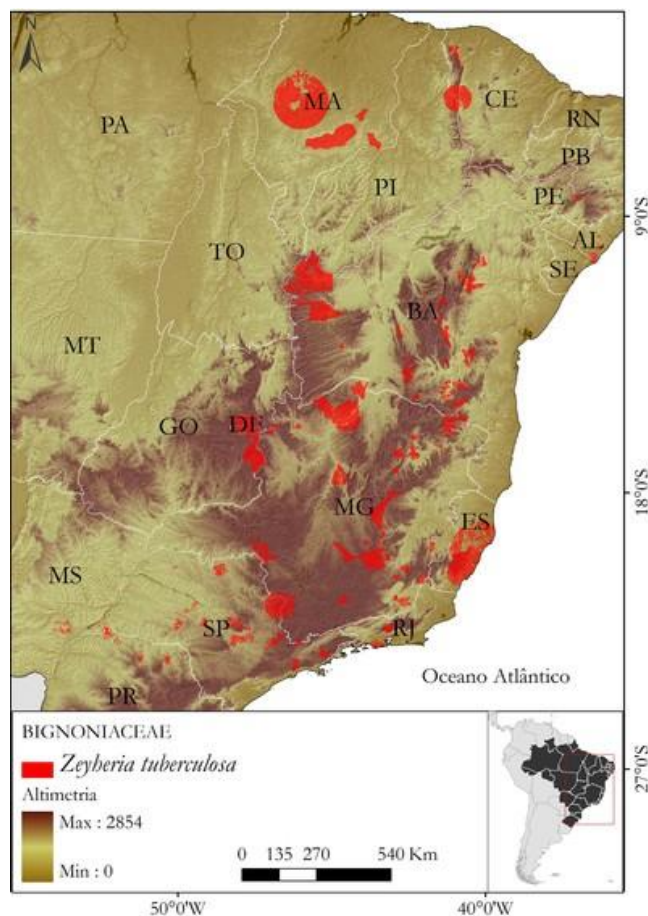
Em estudo realizado com soja foi observado que o alumínio em baixas concentrações (50  $\mu\text{M}$ ) aumentou a atividade da GOGAT. Porém, a atividade dessa enzima decresceu quando submetida à concentração de 500  $\mu\text{M}$  de alumínio, coincidindo com o aumento na atividade da GDH (BALESTRASSE; GALLEGO; TOMARO, 2006). Em plantas o efeito do alumínio sobre a GDH parece ser complexa, uma vez que em arroz, a atividade de aminação dessa enzima foi estimulada sob a presença de alumínio no meio de cultivo, enquanto a atividade de desaminação diminuiu (MISHRA; DUBEY, 2011).

Apesar dos estudos supracitados sobre a interação do alumínio com o nitrogênio em plantas, informações sobre como esse metal atua na absorção e assimilação do nitrogênio em espécies arbóreas nativas do Brasil são escassas. Dessa forma, há uma necessidade de mais estudos para avaliar se diferentes fontes de nitrogênio, como  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4^+$ , podem mitigar possíveis estresses causados pelo alumínio nessas plantas.

## 2.4 *Zeyheria tuberculosa*

A família botânica Bignoniaceae apresenta expressiva diversidade de espécies no Brasil, porém o gênero *Zeyheria* é representado por apenas duas espécies: *Zeyheria montana* Mart. e *Zeyheria tuberculosa*. Essa última possui distribuição restrita a apenas dois países da América do Sul (Brasil e Bolívia) e está presente nos biomas Amazônia, Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica (FIGURA 1) (MARTINELLI; MORAES, 2013). Possui hábito arbóreo, podendo alcançar de 6 a 35 m de altura, e comportamento semidecíduo. É uma espécie hermafrodita com flores que variam da cor amarela a creme, com manchas vermelhas, e dispostas em inflorescência em tirso terminal. Os frutos dessa espécie são do tipo cápsula orbicular, achatada, lenhosa, deiscente, cobertos por uma densa camada de pelos e externamente muricada. Cada fruto pode produzir de 56 a 150 sementes aladas, achatadas, com 4 a 6,2 cm de diâmetro, envolta numa asa celulósica fina, com núcleo cordiforme, branco-amarelado e felpudo (CARVALHO, 2005).

Figura 1 – Mapa de distribuição de *Zeyheria tuberculosa* no Brasil.



Fonte: CNCFlora (2023)

A floração de *Z. tuberculosa* ocorre entre outubro e janeiro, podendo ter grandes variações devido à localização de ocorrência (CARVALHO, 2005; SOUZA *et al.*, 2017). Os indivíduos dessa espécie são auto-incompatíveis, necessitando de um vetor para transferência de pólen entre os indivíduos. *Z. tuberculosa* apresenta atributos associados à melitofilia, sendo polinizadas por abelhas do gênero *Bombus* (SOUZA *et al.*, 2017). A síndrome de dispersão de sementes dessa espécie é do tipo anemocoria, ou seja, seus diásporos são dispersos pelo vento podendo ultrapassar até 100 m de distância da planta-mãe (CARVALHO, 2005).

A faixa ótima de temperatura para germinação de sementes de *Z. tuberculosa* é entre 25 a 30° C e suas sementes são sensíveis ao estresse salino, porém não ao déficit hídrico. Uma capacidade de campo de 65% do substrato é adequada para o crescimento inicial de mudas dessa espécie (MEDEIROS *et al.*, 2023). O pH também é um fator limitante para a germinação e estabelecimento de plântulas dessa espécie, apresentando melhores resultados em condições de pH ácido na faixa de 4,7 e 6,7 (FERREIRA *et al.*, 2023).

Os indivíduos de *Z. tuberculosa* possuem madeira de ótima qualidade, utilizada na construção civil e na fabricação de cercas e ferramentas, além de suas sementes possuírem valor

comercial (MARTINELLI; MORAES, 2013). Alguns estudos vêm demonstrando que essa espécie também possui propriedades cicatrizantes (SARMENTO *et al.*, 2014) e antibacteriana (RAMOS *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2014; SILVA *et al.*, 2015), demonstrando potencial para uso farmacológico.

Devido a sua alta taxa de sobrevivência quando plantadas em áreas degradadas, *Z. tuberculosa* possui potencial para uso em programas de recuperação dessas áreas (VIANA *et al.*, 2019). Em sistema silvipastoris, *Z. tuberculosa* se mostrou como uma possível fonte de nutrientes, em especial nitrogênio, potássio e cálcio. Além disso, essa espécie produz um elevado volume de serrapilheira, aumentando a quantidade de matéria orgânica e diminuindo a disponibilidade de alumínio e a acidez das camadas mais superficiais do solo (REIS *et al.*, 2010). Ademais, devido ao alto índice de sobrevivência e incremento médio anual em dióxido de carbono de *Z. tuberculosa*, essa espécie se mostra promissora para plantios de restauração e neutralização de carbono em projetos para mitigar mudanças climáticas (ALBUQUERQUE *et al.*, 2022). Essa espécie também apresenta alta capacidade de se recuperar da seca, o que apoia o seu potencial papel em futuro uso para reflorestamento em decorrência das alterações climáticas (YAAKOBI *et al.*, 2023).

Além disso, a inclusão de *Z. tuberculosa* na lista de espécies classificadas como em risco de extinção devido a sua elevada exploração (MARTINELLI; MORAES, 2013) fomenta a necessidade de desenvolver estudos que visem compreender as necessidades nutricionais e quais os possíveis fatores estressores que possam prejudicar seu desenvolvimento. Para que, assim, se possa desenvolver técnicas de manejo adequado para produção de mudas e obter melhores resultados na sua propagação.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Obtenção de sementes e produção de mudas**

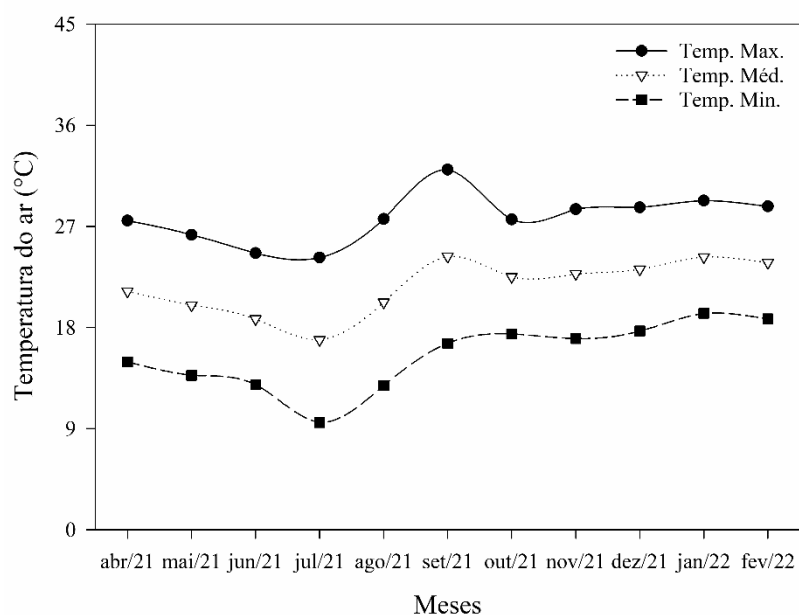
Essa pesquisa foi dividida em dois experimentos: o experimento 1 consistiu em avaliar diferentes concentrações de nitrogênio (2; 4; 8; 12; 16mM N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>); enquanto que, no experimento 2 foram estudadas diferentes proporções de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (100/0; 75/25; 50/50; 25/75; 0/100), com base na dose mais eficiente para o crescimento de *Z. tuberculosa* observada no experimento 1, e diferentes doses de alumínio (0; 600 e 1200 µM).

Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação do Setor de Fisiologia Vegetal na Universidade Federal de Lavras (UFLA). O clima de Lavras é do tipo **Cwa**, segundo a classificação climática de Köppen, caracterizando-se como um clima temperado chuvoso (mesotérmico) com inverno seco e verão chuvoso (DANTAS *et al.*, 2007). A radiação



fotossinteticamente ativa (PAR) dentro da casa de vegetação utilizada no período experimental foi de 321,91  $\mu\text{mol}$ , equivalente a cerca de 30% da radiação externa. Os dados de temperatura ambiental durante a execução dos dois experimentos em casa de vegetação foram obtidos no site do INMET (Instituto Nacional de Meteorologia), na estação meteorológica de Lavras-MG (83687), e estão apresentados na Figura 2. A estação meteorológica da qual os dados foram coletados fica cerca de 200 m de distância da casa de vegetação em que o trabalho foi executado.

Figura 2 – Flutuações na temperatura ambiental máxima, média e mínima em Lavras no período de execução do experimento 1 e 2. Dados no site do INMET.



Fonte: A autora (2023)

Para a produção das mudas, frutos de *Z. tuberculosa* foram coletados de matrizes, em campo, no município de Nepomuceno-MG em agosto de 2020. Os frutos então, foram postos para secar espalhados em bandejas e mantidos em ambientes com circulação de ar, porém sem incidência de luz solar direta. Posteriormente, os frutos foram expostos a pleno sol, por cerca de dois dias, até sua completa deiscência. As sementes foram extraídas manualmente e armazenadas em geladeira até a semeadura.

As sementes foram beneficiadas manualmente com a extração das alas e semeadas em vasos de cinco litros contendo areia lavada. Após dois meses de desenvolvimento, foi feito o desbaste nos vasos mantendo duas mudas por vaso, buscando manter a uniformidade entre os indivíduos.

Nos 30 dias seguintes, as mudas utilizadas no experimento 2 passaram por um período de aclimação, recebendo concentrações crescentes da solução nutritiva, a qual continha todos os macro e micronutrientes, iniciando com  $\frac{1}{4}$  da força, durante sete dias,  $\frac{1}{2}$  força por mais sete dias e força completa pelos 16 dias seguintes. Enquanto que as mudas para o experimento 1

receberam essas mesmas proporções de solução nutritiva, porém correspondendo às diferentes concentrações de nitrogênio de cada tratamento. Após esse período de aclimação ao sistema de cultivo, as mudas foram submetidas aos tratamentos referentes a cada experimento.

As tabelas com os volumes utilizados para elaboração das soluções nutritivas do experimento 1 e 2 estão apresentadas nos APÊNDICE A e APÊNDICE B, respectivamente.

### **3.2 Experimento 1: Efeito de diferentes concentrações de nitrogênio nítrico sobre o crescimento inicial e nos metabolismos do nitrogênio, carbono e antioxidante em *Z. tuberculosa***

#### **3.2.1 Preparo de soluções nutritivas**

As concentrações de cada macro e micronutriente, em ppm ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ), das soluções estoque utilizadas nesse experimento seguiram as recomendações de Bolle-Jones (1957) com modificações, por ser mais indicada no cultivo de espécies arbóreas (VIEIRA *et al.*, 2017). Os sais utilizados nesse experimento foram:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ;  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ;  $\text{K}_2\text{SO}_4$ ;  $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ;  $\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}/\text{Na}_2\text{EDTA}$ ;  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ;  $\text{MnSO}_4\cdot \text{H}_2\text{O}$ ;  $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ;  $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$  – 9,45 mM;  $\text{Na}_2\text{MoO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (85%  $\text{MoO}_3$ );  $\text{CaSO}_4$  e  $\text{KNO}_3$  nas concentrações de acordo com a Tabela 1.

Os tratamentos desse primeiro experimento consistiram em diferentes níveis de nitrogênio presentes nas soluções nutritivas, tendo o  $\text{NO}_3^-$  como fonte única de nitrogênio ( $\text{N-NO}_3^-$ ). As concentrações de nitrogênio utilizadas foram: 2 mM, 4 mM, 8 mM, 12 mM e 16 mM de  $\text{N-NO}_3^-$  (DELÚ-FILHO, 1994).

O experimento foi realizado em delineamento em blocos casualizado (DBC), com 5 tratamentos (concentrações de  $\text{N-NO}_3^-$ ), constituídos por 5 repetições composta por 4 plantas distribuídas em 2 vasos.

O pH da solução foi ajustado para pH 6,5, com solução de NaOH ou HCl  $1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , por esse ser considerado ideal para o desenvolvimento das plantas mantendo os macro e micronutrientes disponíveis (MALAVOLTA, 1980; FERREIRA *et al.*, 2023). Quinzenalmente a areia dos vasos foi lavada e posteriormente irrigada com novas soluções, evitando assim, o acúmulo de sais na areia e visando manter a concentração adequada de nutrientes no meio de cultivo. Para manter uma disponibilidade hídrica adequada às plantas, diariamente eram adicionados 200 mL de água deionizada com pH igual ao da solução nutritiva nos pratos em que os vasos estavam acomodados.

A coleta foi realizada após 60 dias de cultivo das mudas nos diferentes tratamentos. Amostras de folhas e raízes foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer -80 para a realização das análises com base na matéria fresca. Quanto às análises que utilizam

matéria seca, as amostras foram secas em estufa de circulação de ar forçada à 65°C até peso constante. As amostras foram pesadas para obtenção da massa seca e em seguida foram moídas em moinho do tipo Willey e armazenadas em tubos plásticos em temperatura ambiente.

Tabela 1 – Concentrações dos nutrientes utilizados em cada tratamento. SNC - solução nutritiva completa.

| Nutrientes | Tratamentos   |               |               |                |                |
|------------|---------------|---------------|---------------|----------------|----------------|
|            | 2 mM<br>(ppm) | 4 mM<br>(ppm) | 8 mM<br>(ppm) | 12 mM<br>(ppm) | 16 mM<br>(ppm) |
| Nitrogênio | 28            | 56            | 112           | 168            | 224            |
| Fósforo    | 31            | 31            | 31            | 31             | 31             |
| Potássio   | 117           | 152           | 195           | 273            | 351            |
| Cálcio     | 95            | 98            | 128           | 168            | 160            |
| Magnésio   | 33            | 43            | 61            | 61             | 90             |
| Enxofre    | 120           | 120           | 120           | 120            | 120            |
| Boro       | 0,7           | 0,7           | 0,7           | 0,7            | 0,7            |
| Cobre      | 0,6           | 0,6           | 0,6           | 0,6            | 0,6            |
| Cloro      | 2,8           | 2,8           | 2,8           | 2,8            | 2,8            |
| Ferro      | 0,5           | 0,5           | 0,5           | 0,5            | 0,5            |
| Manganês   | 0,5           | 0,5           | 0,5           | 0,5            | 0,5            |
| Molibdênio | 0,03          | 0,03          | 0,03          | 0,03           | 0,03           |
| Zinco      | 0,6           | 0,6           | 0,6           | 0,6            | 0,6            |

Fonte: A autora (2023)

### 3.2.2 Análises biométricas

Ao fim do experimento foram medidas a altura das plantas e comprimento radicular, utilizando-se uma régua graduada. A área foliar foi estimado a partir 20 discos de 1cm de diâmetro, evitando a nervura principal, dos quais foi realizada a relação da área foliar específica (Af/PF) com o total de folhas de duas plantas. Para a medição do diâmetro do caule foi utilizado um paquímetro digital. A massa seca da parte aérea e da raiz foi obtida através da secagem das amostras em estufa a 65°C com ventilação forçada até atingir peso constante. As medidas de alocação de biomassa foram mensuradas através da razão raiz/parte aérea.

### 3.2.3 Quantificação de nitrogênio total

Para a determinação dos teores de nitrogênio total foi utilizado o método de Kjeldahl. Para realizar a digestão foi pesado 0,1 g de amostra de folha e raízes moídas e transferidas para tubos de digestão Kjeldahl. A esse material foram adicionados 1,8g de uma mistura (5:1) de  $K_2SO_4$  e  $CuSO_4$ , e posteriormente adicionaram-se 3 ml de ácido sulfúrico lentamente. O material foi levado para bloco digestor ao qual foi submetido a um aumento gradual de temperatura, partindo da temperatura ambiente e aumentado 50°C a cada 30 minutos até alcançar a temperatura final de 350°C. As amostras foram mantidas nessa temperatura final até sua completa digestão, caracterizada pela obtenção de um líquido translúcido levemente esverdeado. Posteriormente, foi feita a destilação, adicionando lentamente 10 mL de NaOH 13 M e a titulação com HCl 0,07143 M, com auxílio de uma bureta, até mudança de cor (coloração verde para rosa). O volume gasto de HCl foi equivalente a porcentagem de nitrogênio na amostra (MALAVOLTA, VITTI e OLIVEIRA 1997).

### 3.2.4 Extração e quantificação de aminoácidos e proteínas totais

A extração de aminoácidos foi feita a partir da massa seca de folhas completamente expandidas e raízes pela homogeneização de 0,2 g de massa seca em 5 mL de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,0), seguido de banho-maria por 30 minutos a 40°C. Posteriormente, a solução homogeneizada foi centrifugada à 5000g, por 10 minutos e o sobrenadante foi coletado. Foi utilizado o extrato da quantificação das enzimas do metabolismo do nitrogênio para a quantificação de proteínas totais. Para a quantificação de aminoácidos foi utilizado o método de ninhidrina, proposto por Yemm e Cocking (1955). Enquanto que a quantificação de proteínas foi realizada segundo Bradford (1976).

### 3.2.5 Enzimas envolvidas no metabolismo do nitrogênio

Para a obtenção do extrato para análise da atividade das enzimas do metabolismo do nitrogênio em folhas e raízes de *Z. tuberculosa* foi pesado 1,25 g de massa fresca (MF), que posteriormente foi macerada em nitrogênio líquido e 10% de polivinilpolipirrolidona (PVPP). Em seguida, foram adicionados 5 mL da solução de incubação composta por tampão fosfato 100 mM (pH 7,5), 1,4-ditiotreitol (DTT) 2mM, fluoreto de fenilmetanosulfonil (PMSF) 1 mM e ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 5 mM. Em seguida o meio de extração foi centrifugado à 16000 g durante 20 min à 4°C. O sobrenadante foi coletado e armazenado em tubo falcon em freezer -80°C. Todas as análises enzimáticas aqui descritas foram feitas em triplicada.

A análise da atividade da NR *in vitro* foi realizada segundo o método proposto por Berges e Harrison (1995). Em microplacas de leituras UV de poços de 180  $\mu\text{L}$  foi adicionado 14  $\mu\text{L}$  do extrato enzimático seguido da adição de 154  $\mu\text{L}$  do meio de incubação composto por tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5) e  $\text{KNO}_3$  10 mM. Em seguida, o meio foi incubado em banho-maria a 30°C por 3 minutos. Após a incubação, utilizando uma pipeta multicanal, foram adicionados 12  $\mu\text{L}$  da solução de  $\beta\text{-NADH}$  3 mM à placa. Em seguida foi realizada a leitura da placa a 340 nm, a cada um minuto, durante 10 min. A oxidação do  $\beta\text{-NADH}$  leva ao decréscimo na absorbância gerando uma curva que será usada para estimar a atividade enzimática. Atividade das enzimas foi expressa em  $\mu\text{mol de NADH}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}\text{ MF}$ . O coeficiente de extinção molar foi  $6,22\text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ .

A atividade da GS foi avaliada como proposto por Ratajczack *et al.* (1981). Em um eppendorf de 2 mL, foi adicionada uma alíquota de 75  $\mu\text{L}$  do extrato bruto juntamente com 175  $\mu\text{L}$  de um meio reacional contendo 50  $\mu\text{L}$  de tampão tris-HCl 500 mM (pH 7,5), 25  $\mu\text{L}$  de mercaptoetanol 100 mM; 12,5  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$  400 mM; 37,5  $\mu\text{L}$  de cloridrato de hidroxilamina ( $\text{NH}_2\text{OHCl}$ ) 100 mM; 25  $\mu\text{L}$  de glutamato monossódico 500 mM e 25  $\mu\text{L}$  de ATP 100 mM. A mistura foi incubada a 30°C por 30 minutos. Após o período de incubação, a reação foi paralisada pela adição de 250  $\mu\text{L}$  de uma solução composta de cloreto férrico ( $\text{FeCl}_3$ ) 370 mM, ácido clorídrico 670 mM e ácido tricloroacético (TCA) 200 mM. Após a paralisação da reação, a solução foi centrifugada a 16000 *g* por 5 minutos a 4°C e o quelato Fe-L-glutamylhidroxamato (GHA) produzido foi determinado em espectrofotômetro a 540 nm e a atividade enzimática expressa em  $\mu\text{mol de GHA}\cdot\text{g}^{-1}\text{ MF}\cdot\text{min}^{-1}$ .

A atividade da NADH-GOGAT foi determinada segundo Groat e Vance (1981) em que uma alíquota de 14  $\mu\text{L}$  do extrato enzimático foi adicionado a 156  $\mu\text{L}$  do meio de incubação composto por tampão de tris-HCl 70 mM (pH 7,8), 2-oxoglutarato 9 mM e L-glutamina 9 mM. Essa mistura foi mantida em incubação a 30°C por cinco minutos e a reação foi iniciada com a adição de 10  $\mu\text{L}$  de  $\beta\text{-NADH}$  3,6 mM. A leitura foi realizada a 340 nm a cada um minuto durante 10 minutos.

Quanto a atividade da GDH foi determinada em uma alíquota de 14  $\mu\text{L}$  seguida da adição do meio de incubação composto por tris-HCl 100 mM (pH 7,8), 2-oxoglutarato 10 mM, de  $\text{CaCl}_2$  4 mM e sulfato de amônio ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) 100 mM. Após três minutos de incubação a 30°C, a reação foi iniciada com a adição de 10  $\mu\text{L}$  de  $\beta\text{-NADH}$  3,6 mM (GROAT; VANCE, 1981). A leitura foi realizada a 340 nm a cada um minuto durante 10 minutos. Os resultados das análises da NADH-GOGAT e GDH foram analisados de forma semelhante à atividade da NR pela oxidação do  $\beta\text{-NADH}$ .

### 3.2.6 Determinação dos teores de pigmentos fotossintéticos

A quantificação dos pigmentos fotossintetizantes seguiu o método proposto por Lichthenthaler e Buschmann (2001), em que foi macerado 0,1 g de folha completamente expandida em acetona 80% e em seguida filtrado. O volume foi padronizado para 10 mL seguindo, então, para a leitura em espectrofotômetro nas absorvâncias 470, 646,8 e 663,2nm, correspondendo aos pigmentos carotenoides, clorofila b e clorofila a, respectivamente. A partir dos valores obtidos, foi calculada a concentração de cada pigmento ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  MF), conforme as equações a seguir:

$$\text{Clorofila a} = 12,25 A_{663,2} - 2,79 A_{646,8}$$

$$\text{Clorofila b} = 21,50 A_{646,8} - 5,10 A_{663,2}$$

$$\text{Clorofilas totais} = 7,15 A_{663,2} + 18,71 A_{646,8}$$

$$\text{Carotenóides (xantofilas + carotenos)} = (1000 A_{470} - 1,82 Ca - 85,02 Cb)/198$$

### 3.2.7 Avaliação de parâmetros fotossintéticos

Utilizando o MultispeQ conectado à plataforma PhotosynQ (KUHLGERT *et al.* 2016), foram avaliadas a fluorescência inicial da clorofila *a* ( $F_0'$ ), fluorescência máxima da clorofila *a* ( $F_m'$ ) e eficiência quântica do fotossistema II obtida pela razão  $F_v'/F_m'$  (sendo a fluorescência variável ( $F_v'$ ) obtida pela diferença entre  $F_0'$  e  $F_m'$ ). Também foram avaliadas a taxa de fluxo de prótons que passam através da ATP sintase ( $\text{gH}^+$ ), taxa de transporte de elétrons (ETR) e o *quenching* não fotoquímico teórico (NPQt). As medições foram realizadas na presença de luz, no segundo par de folhas completamente expandidas, entre 8 e 10 horas da manhã, antes da coleta do experimento. A radiação fotossinteticamente ativa (PAR) no interior da casa de vegetação avaliada no dia das medições foi de  $321,91 \mu\text{mol de fótons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ .

### 3.2.8 Quantificação de carboidratos solúveis e amido

A extração utilizada para quantificação dos carboidratos solúveis foi o mesmo protocolo para quantificação de aminoácidos, já descrito anteriormente. Para a quantificação de açúcares solúveis totais (AST), foi utilizado o método da Antrona (YEMM e WILLIS, 1954). Nesse método uma alíquota de 1 mL do extrato é adicionada a 2 mL da solução reagente composta por 20 mL de ácido sulfúrico concentrado vertido a 40 mg de antrona diluída em 1 mL de água deionizada. Essa mistura de extrato das amostras com a solução reagente é mantida em banho-maria a  $100^\circ\text{C}$  por três minutos. Após o completo resfriamento é feita a leitura das amostras a 620 nm em espectrofotômetro. A quantificação foi realizada, com base na curva padrão de glicose com concentrações conhecidas.

O teor de açúcares redutores (AR) foi avaliado por meio do método DNS, descrito por Miller (1959). Uma alíquota de 0,75 mL do extrato bruto foi adicionada a 0,5 mL do reagente DNS composto por 50 mL de hidróxido de sódio 2 M, 2,5 g de ácido dinitrosalicílico e 75 g de tartarato de sódio e potássio diluídos em 250 mL de água deionizada. Essa mistura foi colocada em banho-maria a 100°C por cinco minutos. Após o completo resfriamento em temperatura ambiente, foram adicionados 3,75 mL de água deionizada e realizada a leitura a 540 nm em espectrofotômetro. A quantificação foi realizada, com base na curva padrão de glicose com concentrações conhecidas.

O pellet resultante do processo de extração dos carboidratos solúveis foi ressuspensionado com 4 mL do tampão acetato de potássio 200 mM (pH 4,8). Foi adicionado 1 mL da solução da enzima amiloglucosidase (1 mg da enzima por 1 mL de tampão acetato de potássio 200 mM pH 4,8), que em seguida as amostras foram incubadas em banho-maria a 40°C por 2 horas e centrifugadas à 5000 rpm durante 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e armazenado em tubos falcon. O amido foi quantificado pelo método da antrona (YEMM e WILLIS, 1954) já descrito anteriormente.

### 3.2.9 Sistema antioxidante

Para a extração das enzimas do sistema antioxidantes, foram maceradas 0,2 g de material fresco de folhas e raízes de *Z. tuberculosa* em nitrogênio líquido. Em seguida foi adicionado 1,5 mL do tampão de extração composto por 375 µL de tampão fosfato de potássio 400 mM (pH 7,8), 15 µL de EDTA 10 mM, 75 µL de ácido ascórbico 200 mM, e 1035 µL de água deionizada. O extrato foi centrifugado à 13000 g por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante foi coletado e armazenado a -80°C durante o período das análises. Os sobrenadantes coletados foram utilizados nas análises enzimáticas da superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e ascorbato peroxidase (APX) (BIEMELT; KEETMAN e ALBRECHT, 1998).

A atividade da SOD foi avaliada pela capacidade da enzima em inibir a fotorredução do azul de nitrotetrazólio (NBT), seguindo o método de Giannopolitis e Ries (1977). O meio de incubação foi composto por fosfato de potássio 50 mM pH 7,8, metionina 14 mM, EDTA 0,1 µM, NBT 75 µM e riboflavina 2 µM. A placa com o mix de amostra e meio de reação (branco não contem amostra) recebeu iluminação por 7 minutos em uma caixa com seu interior forrado com papel alumínio e uma lâmpada fluorescente de 15W. As leituras foram realizadas a 560 nm e o cálculo da enzima foi feito segundo a equação a seguir:

$$\% \text{ de inibição} = \frac{A560 \text{ amostra com extrato enzimático} - A560 \text{ controle sem enzima}}{A560 \text{ controle sem enzima}}$$

Uma unidade da SOD corresponde à quantidade de enzima capaz de inibir em 50% a fotorredução do NBT nas condições do ensaio.

A atividade da CAT foi avaliada seguindo o método de Havir e McHale (1987). Alíquota de 9 µL do extrato enzimático foi adicionada a 162 µL do meio de incubação composto por 90 µL de tampão fosfato de potássio 200 mM pH 7,0 e 72 µL de água deionizada, seguido de incubação a 30°C por três minutos. Em seguida foi adicionado 9 µL de peróxido de hidrogênio 250 mM e a atividade enzimática foi determinada pelo decréscimo na absorbância, devido ao consumo de peróxido de hidrogênio, em leituras a 240 nm, durante três minutos a cada 15 segundos.

Quanto a atividade da APX, uma alíquota de 9 µL do extrato enzimático foi adicionada a 162 µL de tampão de reação (previamente incubado em banho-maria a 30°C), composto por 90 µL de fosfato de potássio 200 mM pH 7,0, 9 µL de ácido ascórbico 10 mM e ao final foi adicionado o 9 µL de peróxido de hidrogênio 4 mM. A atividade enzimática foi determinada através do acompanhamento da taxa de oxidação do ascorbato a 290 nm, a cada 15 segundos, por três minutos (NAKANO; ASADA, 1981).

Para a análise do peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), foi obtido um extrato a partir da maceração de 0,2 g de matéria fresca em nitrogênio líquido com PVPP, homogeneizados em 1,5 mL de ácido tricloroacético (TCA) 0,1% (m/v) e centrifugados a 12000 g por 15 minutos a 4°C. O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi determinado medindo a absorbância a 390 nm em um meio de reação, contendo 45 µL de tampão fosfato de potássio 10 mM (pH 7,0) e 90 µL iodeto de potássio 1 M (VELIKOVA *et al.*, 2000). A quantificação foi realizada, com base na curva padrão de peróxido de hidrogênio com concentrações conhecidas.

### **3.2.10 Análise estatística**

A normalidade dos resíduos foi analisada segundo o teste de Shapiro-Wilk e a homogeneidade da variância seguindo o teste de oneillmathews, ambos os testes a 5% de significância. Os dados foram considerados normais e homogêneos e, portanto, os dados de nitrogênio total foram submetidos a regressão e os demais dados foram submetidos à análise de variância com médias comparadas pelo Teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade, utilizando o programa estatístico R® na plataforma RStudio. Os gráficos foram construídos utilizando o programa Systat SigmaPlot Versão 15.



### **3.3 Experimento 2: Influência do alumínio e diferentes proporções de nitrato e amônio no desenvolvimento inicial e nos metabolismos do nitrogênio, do carbono, antioxidante em *Z. tuberculosa***

#### **3.3.1 Implementação do experimento 2**

Os tratamentos nesse segundo experimento consistiram no cultivo das mudas em diferentes proporções de  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  nas proporções de 100/0; 75/25; 50/50; 25/75 e 0/100, essas proporções foram estabelecidas com base em 10 mM de nitrogênio, e suas interações com as proporções de 0, 600 e 1200  $\mu\text{M}$  de  $\text{Al}^{3+}$ . A escolha da concentração de nitrogênio para esse experimento foi feita a partir das análises de crescimento do primeiro experimento. O segundo experimento foi realizado em delineamento em blocos casualizado (DBC) em esquema fatorial duplo 5x3 (5 proporções  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  e 3 concentrações de  $\text{Al}^{3+}$ ), com 5 repetições composta por 4 plantas distribuídas em 2 vasos.

As demais concentrações de macro e micronutriente, em ppm ( $\text{mg L}^{-1}$ ), das soluções estoque utilizadas nesse experimento foram baseadas nas recomendações de Bolle-Jones (1957) com modificações (TABELA 2). As soluções estoques utilizadas nesse experimento foram compostas pelos seguintes sais:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ;  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ;  $\text{K}_2\text{SO}_4$ ;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ;  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}/\text{Na}_2\text{EDTA}$ ;  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ;  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ;  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (85%  $\text{MoO}_3$ );  $\text{CaSO}_4$  e  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ . O pH da solução foi ajustado para pH 4,5, com solução de  $\text{NaOH}$  ou  $\text{HCl}$  1  $\text{mol.L}^{-1}$ , visando manter o alumínio em sua forma disponível para absorção pelas plantas.

Tabela 2 – Concentrações dos nutrientes em mg/L utilizados nos tratamentos do experimento 2.

| Nutrientes        | 100/0<br>NO <sub>3</sub> /NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> |                 |                  | 75/25<br>NO <sub>3</sub> /NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> |                 |                  | 50/50<br>NO <sub>3</sub> /NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> |                 |                  | 25/75<br>NO <sub>3</sub> /NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> |                 |                  | 0/100<br>NO <sub>3</sub> /NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> |                 |                  |
|-------------------|--------------------------------------------------------|-----------------|------------------|--------------------------------------------------------|-----------------|------------------|--------------------------------------------------------|-----------------|------------------|--------------------------------------------------------|-----------------|------------------|--------------------------------------------------------|-----------------|------------------|
|                   | 0Al<br>(mg/L)                                          | 600Al<br>(mg/L) | 1200Al<br>(mg/L) | 0Al<br>(mg/L)                                          | 600Al<br>(mg/L) | 1200Al<br>(mg/L) | 0Al<br>(mg/L)                                          | 600Al<br>(mg/L) | 1200Al<br>(mg/L) | 0Al<br>(mg/L)                                          | 600Al<br>(mg/L) | 1200Al<br>(mg/L) | 0Al<br>(mg/L)                                          | 600Al<br>(mg/L) | 1200Al<br>(mg/L) |
| <b>Nitrogênio</b> | 140                                                    | 140             | 140              | 140                                                    | 140             | 140              | 140                                                    | 140             | 140              | 140                                                    | 140             | 140              | 140                                                    | 140             | 140              |
| <b>Fósforo</b>    | 31                                                     | 31              | 31               | 31                                                     | 31              | 31               | 31                                                     | 31              | 31               | 31                                                     | 31              | 31               | 31                                                     | 31              | 31               |
| <b>Potássio</b>   | 117                                                    | 117             | 117              | 117                                                    | 117             | 117              | 117                                                    | 117             | 117              | 117                                                    | 117             | 117              | 117                                                    | 117             | 117              |
| <b>Cálcio</b>     | 200                                                    | 200             | 200              | 150                                                    | 150             | 150              | 100                                                    | 100             | 100              | 45                                                     | 45              | 45               | 80                                                     | 80              | 80               |
| <b>Magnésio</b>   | 30                                                     | 30              | 30               | 30                                                     | 30              | 30               | 30                                                     | 30              | 30               | 30                                                     | 30              | 30               | 30                                                     | 30              | 30               |
| <b>Enxofre</b>    | 63                                                     | 92              | 121              | 98                                                     | 105             | 134              | 143                                                    | 172             | 201              | 183                                                    | 210             | 241              | 287                                                    | 316             | 335              |
| <b>Boro</b>       | 0,7                                                    | 0,7             | 0,7              | 0,7                                                    | 0,7             | 0,7              | 0,7                                                    | 0,7             | 0,7              | 0,7                                                    | 0,7             | 0,7              | 0,7                                                    | 0,7             | 0,7              |
| <b>Cobre</b>      | 0,6                                                    | 0,6             | 0,6              | 0,6                                                    | 0,6             | 0,6              | 0,6                                                    | 0,6             | 0,6              | 0,6                                                    | 0,6             | 0,6              | 0,6                                                    | 0,6             | 0,6              |
| <b>Cloro</b>      | 2,8                                                    | 2,8             | 2,8              | 2,8                                                    | 2,8             | 2,8              | 2,8                                                    | 2,8             | 2,8              | 2,8                                                    | 2,8             | 2,8              | 2,8                                                    | 2,8             | 2,8              |
| <b>Ferro</b>      | 0,5                                                    | 0,5             | 0,5              | 0,5                                                    | 0,5             | 0,5              | 0,5                                                    | 0,5             | 0,5              | 0,5                                                    | 0,5             | 0,5              | 0,5                                                    | 0,5             | 0,5              |
| <b>Manganês</b>   | 0,5                                                    | 0,5             | 0,5              | 0,5                                                    | 0,5             | 0,5              | 0,5                                                    | 0,5             | 0,5              | 0,5                                                    | 0,5             | 0,5              | 0,5                                                    | 0,5             | 0,5              |
| <b>Molibdênio</b> | 0,03                                                   | 0,03            | 0,03             | 0,03                                                   | 0,03            | 0,03             | 0,03                                                   | 0,03            | 0,03             | 0,03                                                   | 0,03            | 0,03             | 0,03                                                   | 0,03            | 0,03             |
| <b>Zinco</b>      | 0,6                                                    | 0,6             | 0,6              | 0,6                                                    | 0,6             | 0,6              | 0,6                                                    | 0,6             | 0,6              | 0,6                                                    | 0,6             | 0,6              | 0,6                                                    | 0,6             | 0,6              |
| <b>Alumínio</b>   | 0                                                      | 16,19           | 32,38            | 0                                                      | 16,19           | 32,38            | 0                                                      | 16,19           | 32,38            | 0                                                      | 16,19           | 32,38            | 0                                                      | 16,19           | 32,38            |

Fonte: Da autora (2023)

As mudas que foram utilizadas nesse experimento foram semeadas logo após a coleta do experimento 1 e o processo de aclimação seguiu o mesmo protocolo aqui já mencionado no experimento anterior. As análises realizadas nesse experimento foram as mesmas do experimento anterior, exceto as análises dos parâmetros fotossintético e comprimento da raiz.

Além das análises já descritas anteriormente, foram avaliados os parâmetros a seguir.

### **3.3.2 Quantificação de fósforo (P) e alumínio (Al)**

O material (folha e raiz) para quantificação de P e Al foi obtido a partir da digestão nitroperclórica segundo Malavolta, Vitti e Oliveira (1997). Foram adicionados 4 mL de ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ) e 2 mL de ácido perclórico ( $\text{HClO}_4$ ), seguido de repouso por duas horas. Em seguida o material foi levado para bloco digestor com temperatura controlada para aumento gradual de quatro temperaturas (60, 90, 110 e 200°C) em capela. Após finalizado a digestão e o material estar em temperatura ambiente, adicionaram-se 50 mL de água deionizada a cada tudo. O conteúdo da digestão foi utilizado para determinar os teores de P e Al por espectrometria de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES), da marca Spectro, modelo Blue (Alemanha), com correção de fundo. Os parâmetros de operação e do sistema de introdução da amostra foram conforme indicação do fabricante. O gás utilizado foi o argônio com pureza maior do que 99,99%. O software Smart Analyser Vision foi empregado para a obtenção e processamento dos dados gerados.

### **3.3.3 Quantificação de nitrato e amônio**

O  $\text{NO}_3^-$  foi determinado utilizando matéria seca de folhas e raízes pelo método descrito por Cataldo *et al.* (1975). A preparação do extrato consistiu na homogeneização de 100 mg de material vegetal em 10 mL de água deionizada. Os tubos foram levados a banho-maria a 45°C por 60 minutos e, em seguida, foram centrifugados a 5000g por 15 minutos. Uma alíquota de 50  $\mu\text{L}$  do sobrenadante foi adicionado a 200  $\mu\text{L}$  do reagente sulfo-salicílico (ácido salicílico 5% p/v em  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado) agitando-se cada tubo. Decorridos 20 minutos, em temperatura ambiente, foram adicionados 4,75 mL de NaOH 2 M, lentamente, em cada amostra. Após resfriamento à temperatura ambiente, os tubos foram agitados novamente e a leitura foi realizada em absorbância a 410 nm.

O extrato para a determinação do  $\text{NH}_4^+$  foi obtido colocando-se 60 mg de material fresco em 1,5 mL de água ultrapura. As amostras foram incubadas a 80°C, em banho-maria, por 10 minutos e, em seguida, centrifugados a 4000 rpm por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante de cada amostra foi mantido sempre em gelo durante as análises. Para a quantificação do  $\text{NH}_4^+$ ,

100 µL do reagente I (Fenol 0,1 M + nitroprussiato de sódio 170 µM) e 100 µL do reagente II (hidróxido de sódio 0,125 M + fosfato de sódio dibásico 0,15 M + hipoclorito de sódio – 3% Cl<sub>2</sub>) foram adicionados a 20 µL da amostra. Em seguida os tubos foram mantidos em banho-maria a 37°C por 60 minutos. Após as amostras atingirem a temperatura ambiente foram feitas as leituras a 625 nm (MCCULLOUGH, 1967).

### 3.3.4 Quantificação de prolina

Para a quantificação de prolina foi utilizado o método descrito por Bates (1973), em que 0,1 g de folha ou raízes de *Z. tuberculosa* moídos foi homogeneizado em 5 mL de ácido sulfosalicílico 3% (p/v). Esse material foi mantido em agitação constante, em temperatura ambiente, por 60 minutos. Em seguida, o material foi centrifugado a 5000 rpm por 10 minutos. Uma alíquota de 1 mL do extrato foi homogeneizada em 1 mL de solução de ninhidrina (2,5 g de ninhidrina diluído em 40 mL de ácido fosfórico 6 M e 60 mL de ácido acético glacial) e 1 mL de ácido acético glacial puro. As amostras foram mantidas em banho-maria a 100°C por 60 minutos. Após esse período de incubação, as amostras foram resfriadas em gelo e levadas a leitura em espectrofotômetro a 520 nm. Os dados foram submetidos a uma curva padrão composta por concentrações de prolina conhecidas.

### 3.3.5 Avaliação da peroxidação lipídica

Para avaliar a peroxidação lipídica em folhas e raízes de *Z. tuberculosa*, utilizou-se o protocolo descrito por Freitas-Silva, Castro e Campos da Silva (2021). Para a realização dessa análise, 90 mg de folhas ou raízes frescas maceradas em nitrogênio líquido e 10% de PVPP e homogeneizadas em 1,2 mL de reagente composto por 20% (p/v) de ácido tricloroacético e 0,5% (p/v) de ácido tiobarbitúrico (TBA+TCA). Em seguida as amostras foram aquecidas a 95°C por 30 min, refrigeradas por 15 min em gelo e centrifugadas a 10000 g por 15 minutos. O complexo de MDA+TBA formado na reação foi medida através de leitura em espectrofotômetro em absorbância específica a 532 nm e inespecífica a 600 nm, sendo a absorbância inespecífica subtraída da específica. A quantidade de MDA foi calculada a partir de um coeficiente de extinção de 155 mM<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

### 3.3.6 Análise estatística

A normalidade dos resíduos foi analisada segundo o teste de Shapiro-Wilk e a homogeneidade da variância seguindo o teste de oneillmathews, ambos os testes a 5% de significância. Os dados foram considerados normais e homogêneos e, portanto, as interações entre os fatores foram submetidas à análise de variância com médias comparadas pelo Teste de

Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade, utilizando o programa estatístico R<sup>®</sup> na plataforma RStudio. Os gráficos foram construídos utilizando o programa Systat SigmaPlot Versão 15.

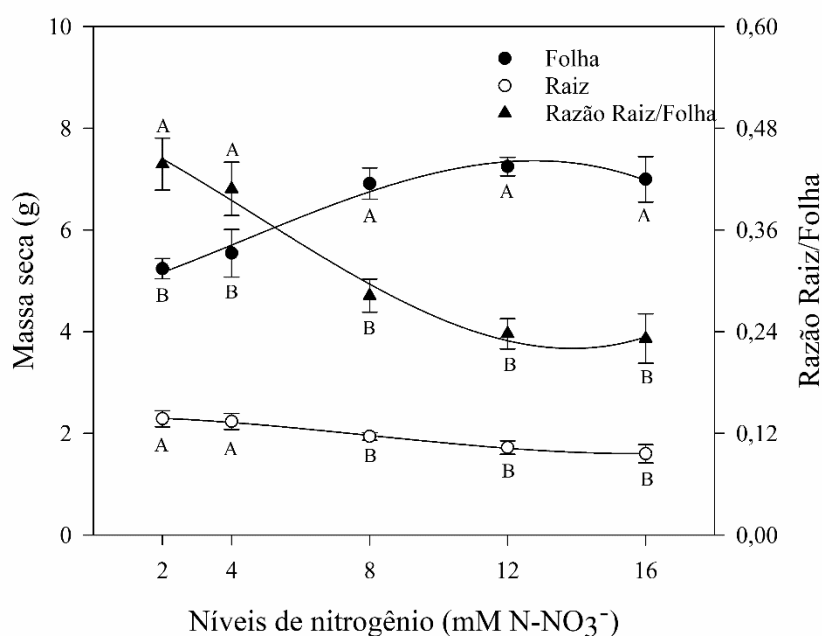
#### 4. RESULTADOS

##### 4.1 Efeito de diferentes concentrações de nitrogênio sobre o crescimento inicial e nos metabolismos do nitrogênio, carbono e antioxidante em *Z. tuberculosa*

###### *Análises biométricas*

O suprimento de nitrogênio até o nível ótimo para *Z. tuberculosa* (8mM N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) causou um aumento na massa seca das folhas e diminuição nos valores de massa seca da raiz e razão de massa raiz/folha (FIGURA 3).

Figura 3 – Massa seca em folhas e raízes e razão raiz/folha em plantas jovens de *Z. tuberculosa* sob diferentes concentrações de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os valores médios (n=10) de cada tratamento comparado pelo teste de Scott-Knott (P < 0,05). As barras verticais correspondem ao erro padrão.



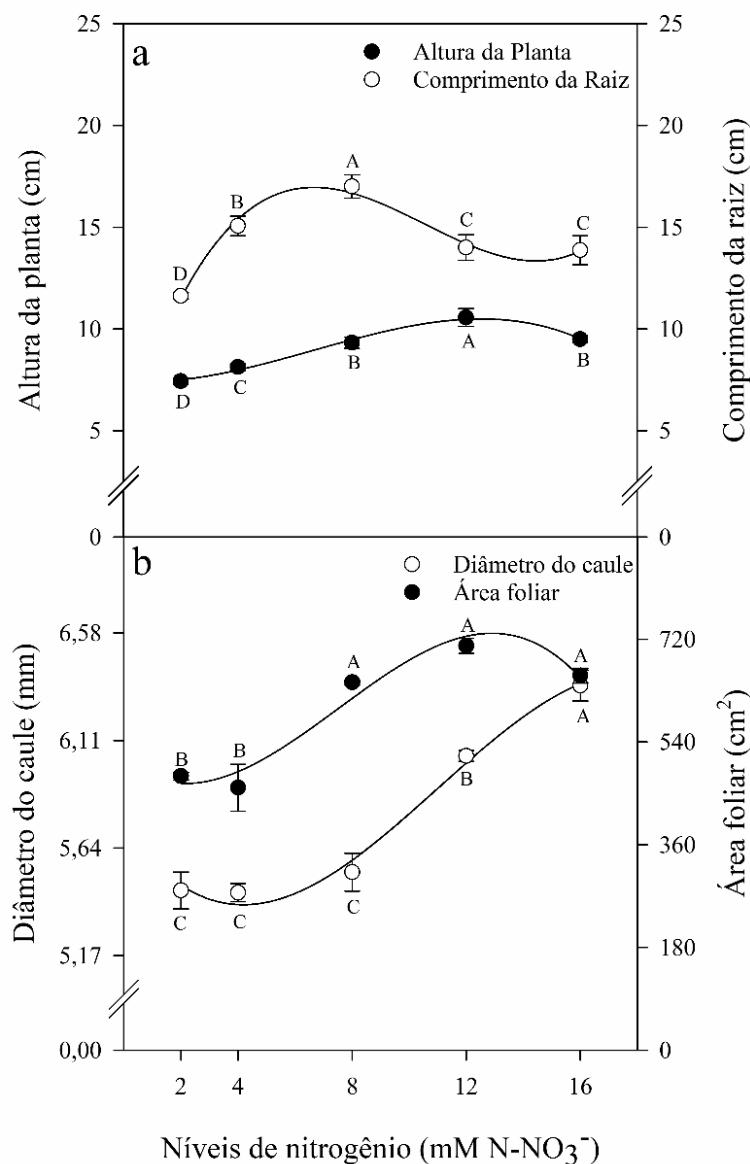
Fonte: Da autora (2023)

O aumento no suprimento de nitrogênio também levou a maior altura da planta até a concentração de 12mM N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (FIGURA 4A). Seguido de um decréscimo significativo de 10% no tratamento de 16mM N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> em relação ao tratamento de 12mM N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Com relação ao comprimento da raiz, houve um acréscimo gradual até o tratamento de 8mM N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Enquanto nos tratamentos de 12mM e 16mM N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> esses valores decresceram significativamente. (FIGURA 4A).

Menor suprimento de nitrogênio às plantas levou a menores valores para o diâmetro do caule e área foliar (FIGURA 4B). A área foliar em mudas expostas a 2mM e 4mM N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> foi 29,8% menor em relação aos demais tratamentos com maior disponibilidade de nitrogênio

(FIGURA 4B). Enquanto observou-se um aumento no diâmetro do caule das mudas a partir do tratamento com 12mM N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (FIGURA 4B).

Figura 4 – Altura da planta, comprimento da raiz, diâmetro do caule e área foliar de plantas jovens de *Z. tuberculosa* sob diferentes concentrações de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os valores médios (n=10) de cada tratamento comparado pelo teste de Scott-Knott (P< 0,05). As barras verticais correspondem ao erro padrão.



Fonte: A autora (2023)

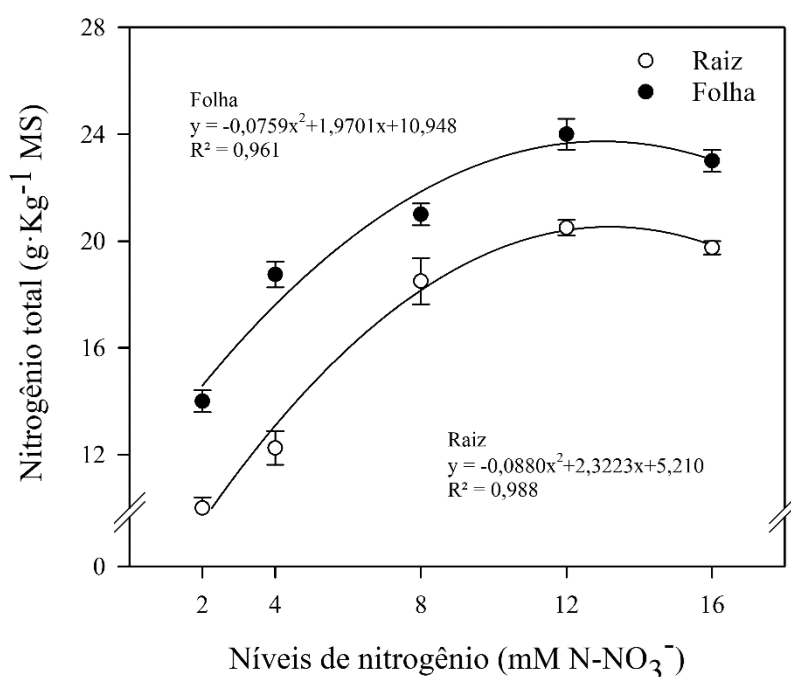
#### *Compostos nitrogenados e enzimas de assimilação do nitrogênio*

O teor de nitrogênio total nas raízes e folhas de *Z. tuberculosa* foi crescente até o tratamento de 12mM N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> onde apresentou seu ponto crítico de absorção de nitrogênio (FIGURA 5). No entanto, a diferença entre os valores obtidos em 8mM e 12mM foi de apenas 12,5% e 9,75% nas folhas e raízes, respectivamente. Indicando que uma concentração intermediária entre esses pontos já resultaria em absorção ideal de nitrogênio para o

desenvolvimento inicial dessa espécie. É importante ressaltar que, sob a concentração de 16mM de  $\text{N-NO}_3^-$ , observou-se uma tendência de queda no acúmulo de nitrogênio total em folhas e raízes das plantas em estudo.

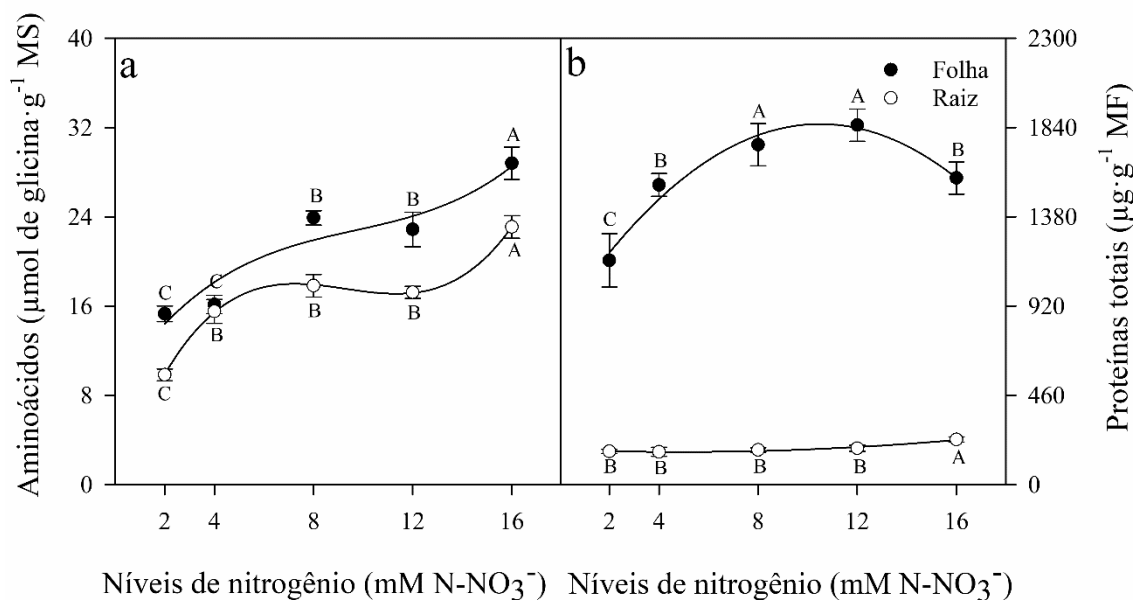
Assim como os níveis de nitrogênio total, os valores de aminoácidos totais aumentaram nos tratamentos com maior disponibilidade de nitrogênio, apresentando um aumento de 46,88% e 57,4% no tratamento de 16mM  $\text{N-NO}_3^-$  quando comparado ao tratamento de 2mM  $\text{N-NO}_3^-$  nas folhas e raízes, respectivamente (FIGURA 6a). Quanto aos níveis de proteínas totais, nas folhas houve um aumento progressivo até o tratamento com 12mM  $\text{N-NO}_3^-$ , seguida de diminuição no tratamento sob 16mM  $\text{N-NO}_3^-$  (FIGURA 6b). Por outro lado, nas raízes os níveis de proteínas totais mantiveram constantes até o tratamento 12mM  $\text{N-NO}_3^-$ , seguido de um aumento de 19,55% sob o tratamento 16mM  $\text{N-NO}_3^-$  (FIGURA 6b).

Figura 5 – Conteúdo de nitrogênio total em folhas e raízes de plantas jovens de *Z. tuberculosa* sob diferentes concentrações de  $\text{N-NO}_3^-$ . Os pontos no gráfico representam os valores médios ( $n=10$ ) de cada tratamento e as barras verticais correspondem ao erro padrão.



Fonte: A autora (2023)

Figura 6 – Teores de aminoácidos (a) e proteínas totais (b) em folhas e raízes de plantas jovens de *Z. tuberculosa* sob diferentes concentrações de  $\text{N-NO}_3^-$ . Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os valores médios ( $n=10$ ) de cada tratamento comparado pelo teste de Scott-Knott ( $P < 0,05$ ). As barras verticais correspondem ao erro padrão.

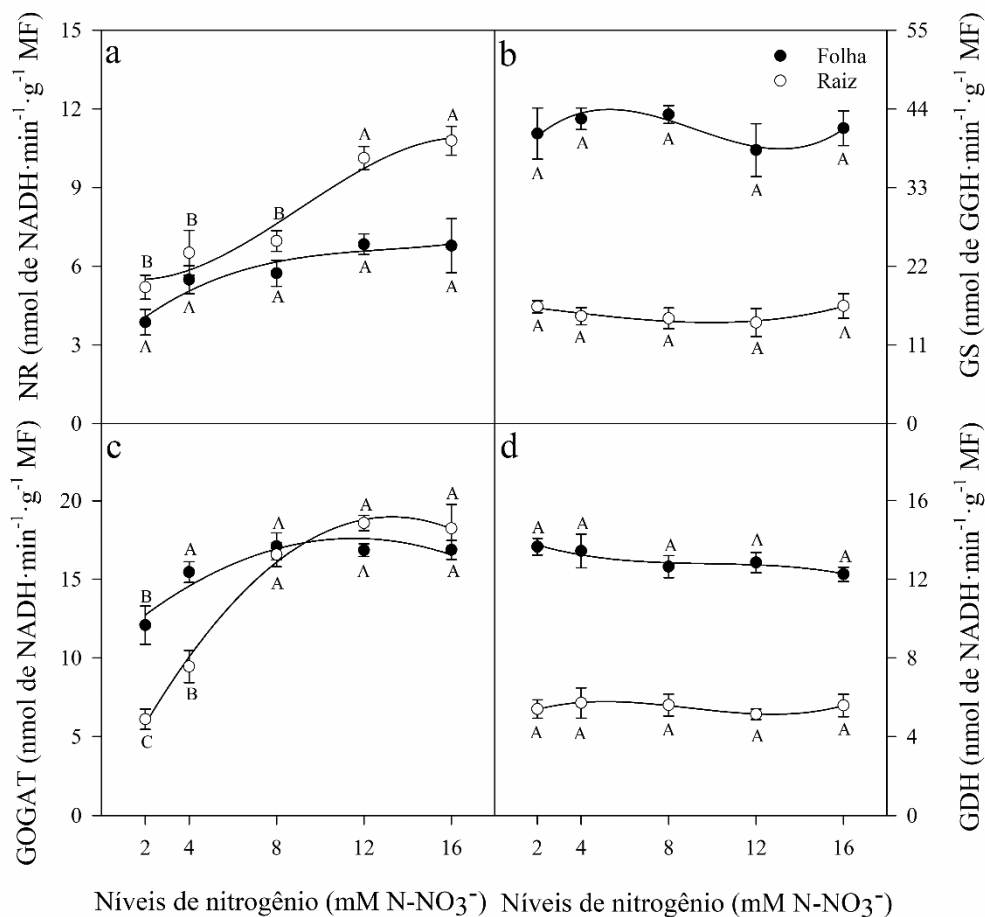


Fonte: Da autora (2023)

A atividade das enzimas envolvidas no metabolismo do nitrogênio apresentou padrões diversos (FIGURA 7). Um maior suprimento de nitrogênio levou a um aumento significativo na atividade da NR apenas nas raízes de *Z. tuberculosa*. Enquanto nas folhas não houve alteração significativa na atividade dessa enzima (FIGURA 7a). De igual modo, não foi observado alterações significativas na atividade da GS em folhas e raízes das plantas estudadas (FIGURA 7b). Em contrapartida, a menor atividade da GOGAT nas folhas foi observada no tratamento 2mM  $\text{N-NO}_3^-$ , havendo a estabilização dessa atividade a partir do tratamento 4mM  $\text{N-NO}_3^-$  (FIGURA 7c). Enquanto nas raízes esse aumento na atividade da GOGAT foi progressivo até o tratamento de 8mM  $\text{N-NO}_3^-$ , seguido de igual estabilização (FIGURA 7c). Não houve alterações significativas na atividade da GDH em folhas e raízes de *Z. tuberculosa* sob as diferentes fontes de nitrogênio (FIGURA 7d).



Figura 7 – Atividade das enzimas NR - nitrato redutase (a), GS - glutamina sintetase (b), GOGAT - glutamato sintase (c) e GDH- glutamato desidrogenase (d) em folhas e raízes de plantas jovens de *Z. tuberculosa* sob diferentes concentrações de  $\text{N-NO}_3^-$ . Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os valores médios ( $n=10$ ) de cada tratamento comparado pelo teste de Scott-Knott ( $P < 0,05$ ). As barras verticais correspondem ao erro padrão.

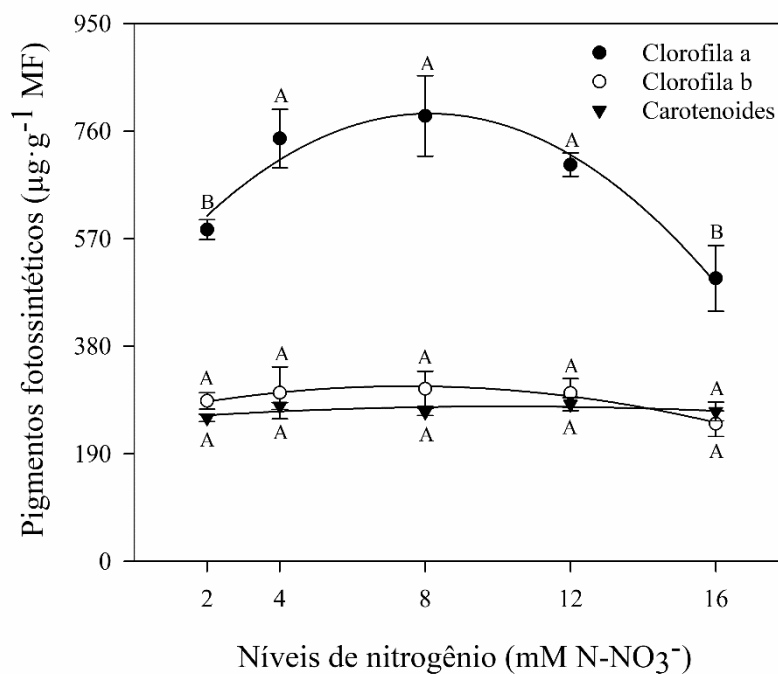


Fonte: Da autora (2023)

### Pigmentos fotossintéticos e fotoquímica

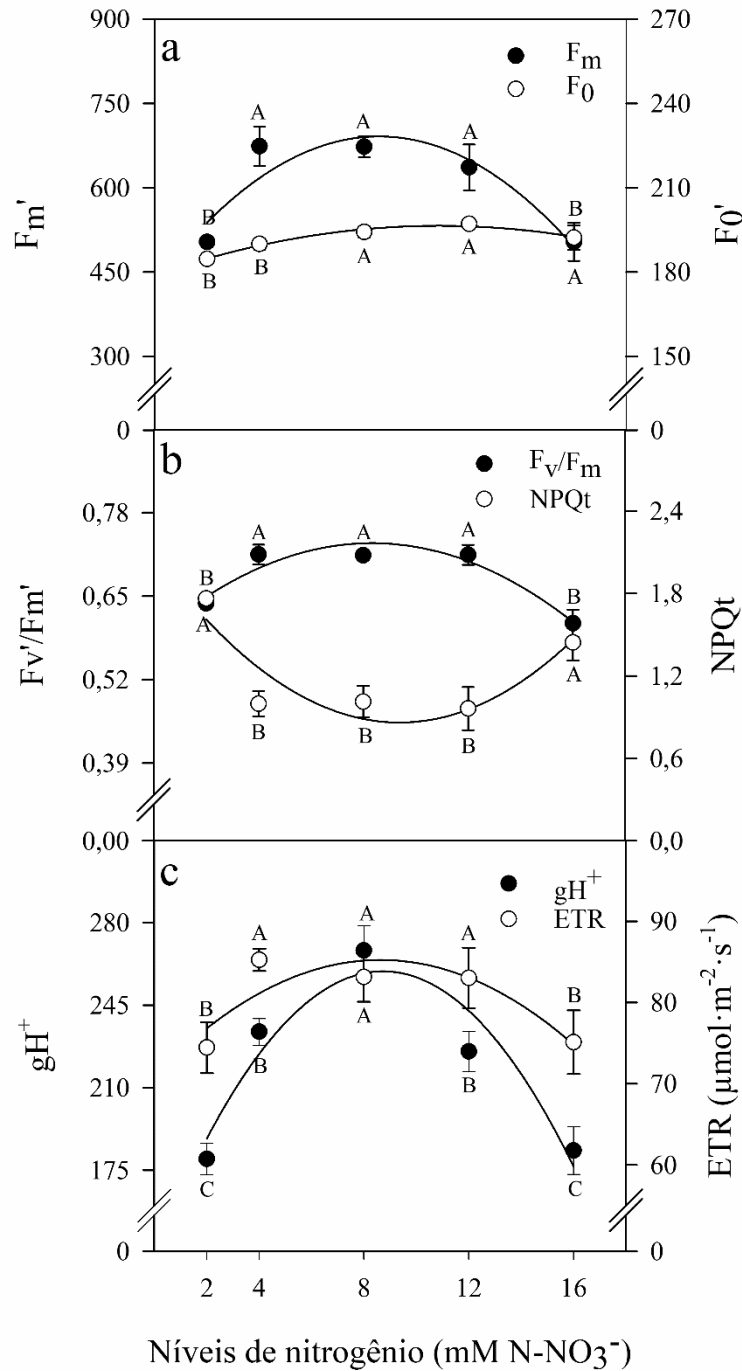
Ao analisar alguns parâmetros fotossintéticos de *Z. tuberculosa* sob as concentrações de nitrogênio, observou-se as menores concentrações de clorofila *a* sob 2mM  $\text{N-NO}_3^-$  e 16mM  $\text{N-NO}_3^-$  nitrogênio (FIGURA 8). Enquanto os níveis de clorofila *b* e carotenoides não foram alterados sob os diferentes teores de nitrogênio (FIGURA 8). Assim como a clorofila *a*, a fluorescência máxima da clorofila *a* ( $F_m'$ ) também seguiu esse mesmo padrão, com maiores valores nas folhas de *Z. tuberculosa* submetidas a 4, 8 e 12mM  $\text{N-NO}_3^-$  (FIGURA 9). Por outro lado, os menores valores da fluorescência inicial da clorofila *a* ( $F_0'$ ) foram observados nos tratamentos contendo 2 e 4mM  $\text{N-NO}_3^-$  (FIGURA 9a).

**Figura 8** – Teores de clorofila a, clorofila b e carotenoides em folhas de plantas jovens de *Z. tuberculosa* sob diferentes concentrações de  $\text{N-NO}_3^-$ . Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os valores médios ( $n=10$ ) de cada tratamento comparado pelo teste de Scott-Knott ( $P < 0,05$ ). As barras verticais correspondem ao erro padrão.



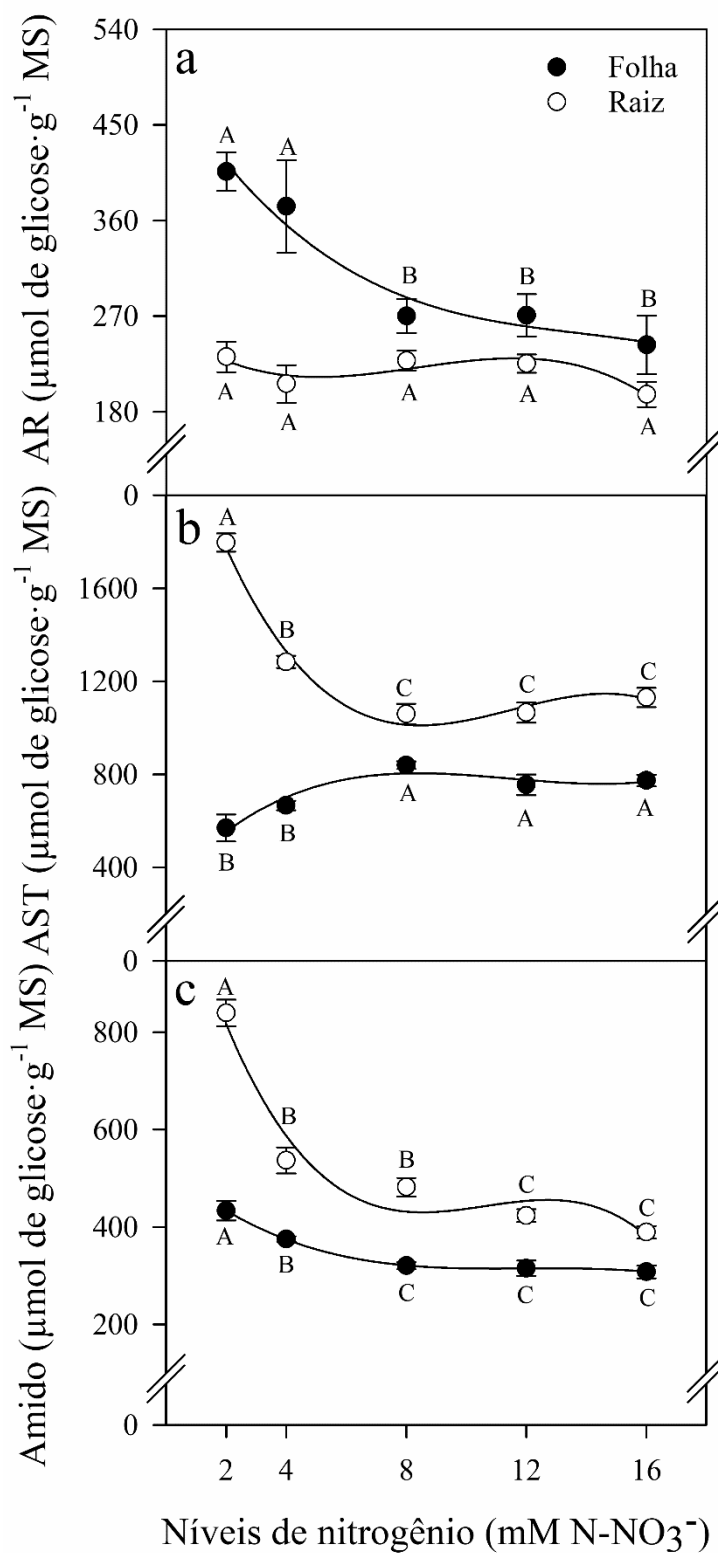
Fonte: Da autora (2023)

Figura 9 –  $F_m'$  - fluorescência máxima da clorofila a (a),  $F_0'$  - fluorescência inicial da clorofila a (a),  $F_v'/F_m'$  - eficiência quântica do fotossistema II (b), NPQt - *quenching* não fotoquímico teórico (b),  $gH^+$  - taxa de fluxo de prótons que passam através da ATP sintase (c) e ETR - taxa de transporte de elétrons (c) em plantas jovens de *Z. tuberculosa* sob diferentes concentrações de  $N-NO_3^-$ . Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os valores médios ( $n=10$ ) de cada tratamento comparado pelo teste de Scott-Knott ( $P < 0,05$ ). As barras verticais correspondem ao erro padrão.



Fonte: Da autora (2023)

Figura 10 – Teor de AR – açúcares redutores (a), AST – açúcares solúveis totais (b) e amido (c) em folhas e raízes de plantas jovens de *Z. tuberculosa* sob diferentes concentrações de  $\text{N-NO}_3^-$ . Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os valores médios ( $n=10$ ) de cada tratamento comparado pelo teste de Scott-Knott ( $P < 0,05$ ). As barras verticais correspondem ao erro padrão.



Fonte: A autora (2023)

Assim como os valores de clorofila *a* e  $F_m'$ , a eficiência quântica do fotossistema II ( $F_v/F_m$ ) foi 10,6% e 14,9% menor em indivíduos sob os tratamentos de 2mM N-NO<sub>3</sub> e 16mM N-NO<sub>3</sub>, respectivamente, em relação aos demais tratamentos (FIGURA 9b). Em contrapartida, os valores de *quenching* não fotoquímico teórico (NPQt) foram inversos aos valores de  $F_v'/F_m'$ , sendo os tratamentos de 2mM N-NO<sub>3</sub> e 16mM N-NO<sub>3</sub> os que apresentaram os maiores valores desse parâmetro (FIGURA 9b).

Seguindo o padrão observado na maior parte dos parâmetros da fotoquímica, a taxa de transporte de elétrons (ETR) pela cadeia transportadora de elétrons também foi mais elevada nos tratamentos intermediários de 4, 8 e 12mM N-NO<sub>3</sub> (FIGURA 9c). Quanto aos valores da taxa de fluxo de prótons que passam através da ATP sintase ( $gH^+$ ), esses aumentaram gradualmente nas folhas até o tratamento de 8mM N-NO<sub>3</sub> e começou a decrescer conforme aumentou a concentração de nitrogênio na solução (FIGURA 9c)

Quanto as análises de carboidratos não estruturais nas folhas, foi observado maiores concentrações de AR nos dois primeiros tratamentos que possuíam disponibilidade de nitrogênio para as plantas, perfazendo uma diferença média de 33% em relação aos demais tratamentos (FIGURA 10a). Nas raízes não houve modificações significativas nos teores de AR (FIGURA 10a).

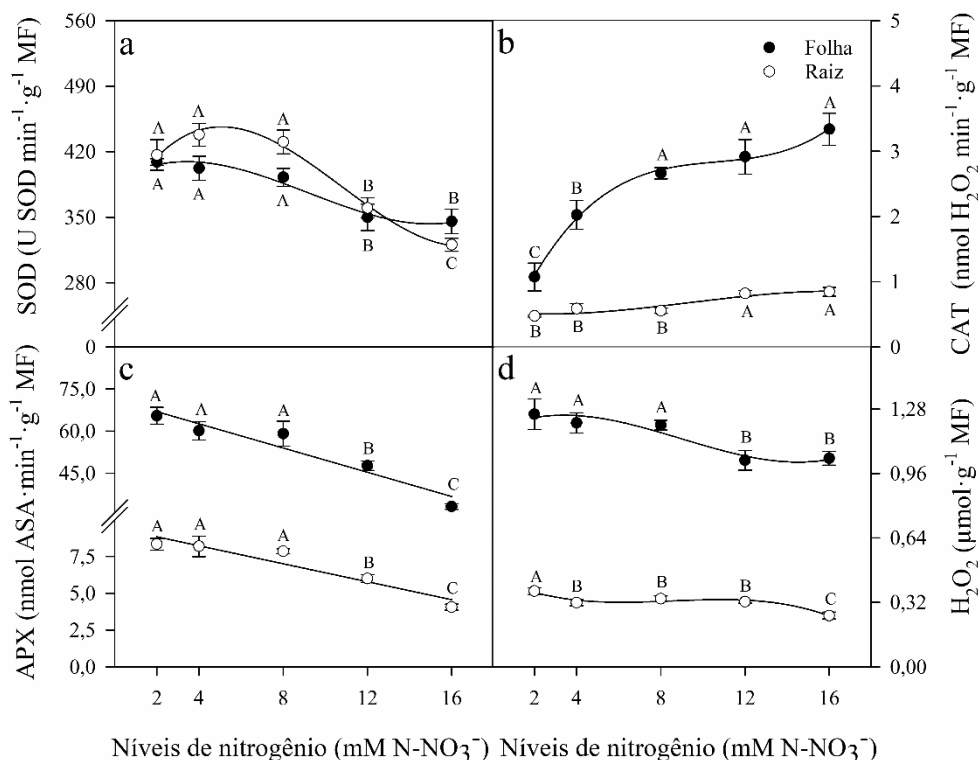
Com relação aos AST, os teores desses açúcares nas folhas de *Z. tuberculosa* decresceram progressivamente seguindo o aumento na disponibilidade de nitrogênio para as plantas até o nível de 8mM N-NO<sub>3</sub>, onde houve uma estabilização nos teores dessas moléculas (FIGURA 10b). O padrão de acúmulo de AST nas raízes dessa espécie foi inverso ao observado nas folhas, havendo aumento nos seus teores até o tratamento 8mM N-NO<sub>3</sub> para então ocorrer uma estabilização (FIGURA 10b). Com relação ao armazenamento de amido em folhas e raízes de *Z. tuberculosa*, foi observado maiores valores para os tratamentos com menor suprimento de nitrogênio, seguindo-se de um decréscimo gradual até o tratamento de 16mM N-NO<sub>3</sub> em ambos os órgãos das plantas (FIGURA 10c).

#### *Sistema antioxidante*

Assim como as demais vias metabólicas, o sistema antioxidante em *Z. tuberculosa* também foi responsivo às diferentes concentrações de nitrogênio (FIGURA 11). A atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) foi elevada em folhas e raízes de mudas de *Z. tuberculosa* quando estas estavam submetidas à menor disponibilidade de nitrogênio. Sendo que, nas folhas pode-se observar uma diferença média de 13,4% na atividade dessa enzima entre os tratamentos 12mM e 16mM N-NO<sub>3</sub> quando comparado aos tratamentos de 2mM a 8mM N-NO<sub>3</sub> (FIGURA

11a). Quanto a atividade da SOD nas raízes de *Z. tuberculosa*, o menor valor observado foi no tratamento de 16mM N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, correspondendo uma diferença de 25,2% em relação à média dos tratamentos de 2mM a 8mM N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (FIGURA 11a).

Figura 11 – Atividade da SOD - superóxido dismutase (a), CAT - catalase (b), APX - ascorbato peroxidase (c) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - peróxido de hidrogênio (d) em folhas e raízes de plantas jovens de *Z. tuberculosa* sob diferentes concentrações de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os valores médios (n=10) de cada tratamento comparado pelo teste de Scott-Knott (P< 0,05). As barras verticais correspondem ao erro padrão.



Fonte: Da autora (2023)

De forma oposta à SOD, a atividade da enzima catalase (CAT) subiu significativamente nas folhas e raízes dos tratamentos conforme houve maior suprimento nitrogênio para as plantas, chegando a um aumento médio de 63,9% dos tratamentos de 8mM a 16mM N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> em relação ao tratamento de 2mM nas folhas (FIGURA 11b). Enquanto que, nas raízes a atividade da CAT permaneceu estável até o tratamento com 8mM N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, havendo aumento médio de 35% nos tratamentos com 12mM e 16mM N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (FIGURA 11b).

Quanto a atividade da ascorbato peroxidase (APX), a baixa disponibilidade de nitrogênio levou ao aumento na atividade dessa enzima tanto em folhas como em raízes, sendo os tratamentos de 2mM, 4mM e 8mM N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> com maiores atividades e seguido de um decréscimo de 46% e 50% no tratamento de 16mM N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> em folhas e raízes, respectivamente (FIGURA 11c).

Assim como o padrão de atividade das enzimas antioxidantes, os níveis de peróxido de hidrogênio nas folhas e raízes de *Z. tuberculosa* foram maiores quando as plantas foram submetidas a baixa disponibilidade de nitrogênio (FIGURA 11d). Os níveis de peróxido de hidrogênio nas folhas foram 15,6% maiores nos tratamentos de 2mM a 8mM N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> quando comparados aos demais tratamentos. Enquanto que nas raízes, a maior concentração de peróxido de hidrogênio foi observada no tratamento de 2mM N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e a menor nas plantas expostas a 16mM N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, com uma diferença de 32,3%.

#### **4.2 Influência do alumínio e diferentes proporções de nitrato e amônio no desenvolvimento inicial e nos metabolismos do nitrogênio, do carbono, antioxidante em *Z. tuberculosa***

##### *Análises biométricas*

Na ausência de alumínio, os maiores valores de massa seca das folhas ocorreram com fontes mistas de nitrogênio. Quando submetida ao tratamento 600μM Al<sup>3+</sup>, o aumento no teor de massa seca se deu progressivamente do tratamento 100/0 ao 25/75, seguido de uma queda no tratamento 0/100. Diferentemente, o acúmulo de massa seca nas folhas das plantas expostas à 1200μM Al<sup>3+</sup> foi gradual partindo do tratamento 0/100 ao 75/25 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, com significativo decréscimo no tratamento 100/0. Sob fontes únicas de nitrogênio, a concentração 600μM Al<sup>3+</sup> foi deletéria para o acúmulo de massa seca nas folhas. Sob a proporção 75/25 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, o efeito do alumínio sobre a produção de massa seca foi dependente da concentração desse elemento, uma vez que sob 600μM Al<sup>3+</sup> houve diminuição na massa seca, enquanto que, sob 1200μM Al<sup>3+</sup> o alumínio levou a maior produção de massa seca. Nas proporções de 50/50 e 25/75 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, a exposição das plantas ao alumínio levou a diminuição da massa seca nas folhas (FIGURA 12a).

Nas raízes, a proporção de 75/25 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/NH<sub>4</sub><sup>+</sup> foi a que causou o maior acúmulo de massa seca nesse órgão na ausência de alumínio. Quando submetidas ao tratamento de 600μM Al<sup>3+</sup>, os maiores valores de massa seca na raiz foi observado nas fontes mistas de nitrogênio. Enquanto sob 1200μM Al<sup>3+</sup> os maiores valores nesse parâmetro ocorreram nas proporções de 100/0 e 75/25 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. Em todas as proporções de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, a concentração de 600μM Al<sup>3+</sup> levou a menor teor de massa seca nas raízes, exceto na proporção de 50/50 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, onde o aumento na concentração de alumínio foi inversamente proporcional à produção de massa seca (FIGURA 12b).

A razão raiz/parte aérea, na ausência de alumínio, foi maior na proporção de 75/25 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. Por outro lado, sob 1200μM Al<sup>3+</sup> a maior razão raiz/parte aérea ocorreu sob NH<sub>4</sub><sup>+</sup>

como fonte única de nitrogênio e o menor valor ocorreu sob a proporção 50/50  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ . Na proporção de 100/0  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  apenas a concentração de  $600\mu\text{M Al}^{3+}$  resultou na menor razão raiz/parte aérea. Enquanto nas proporções de 75/25 e 50/50  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  a presença do alumínio levou ao decréscimo desse parâmetro. Em contrapartida, sob 0/100  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  a maior concentração de alumínio aumentou a razão raiz/parte aérea (FIGURA 12c).

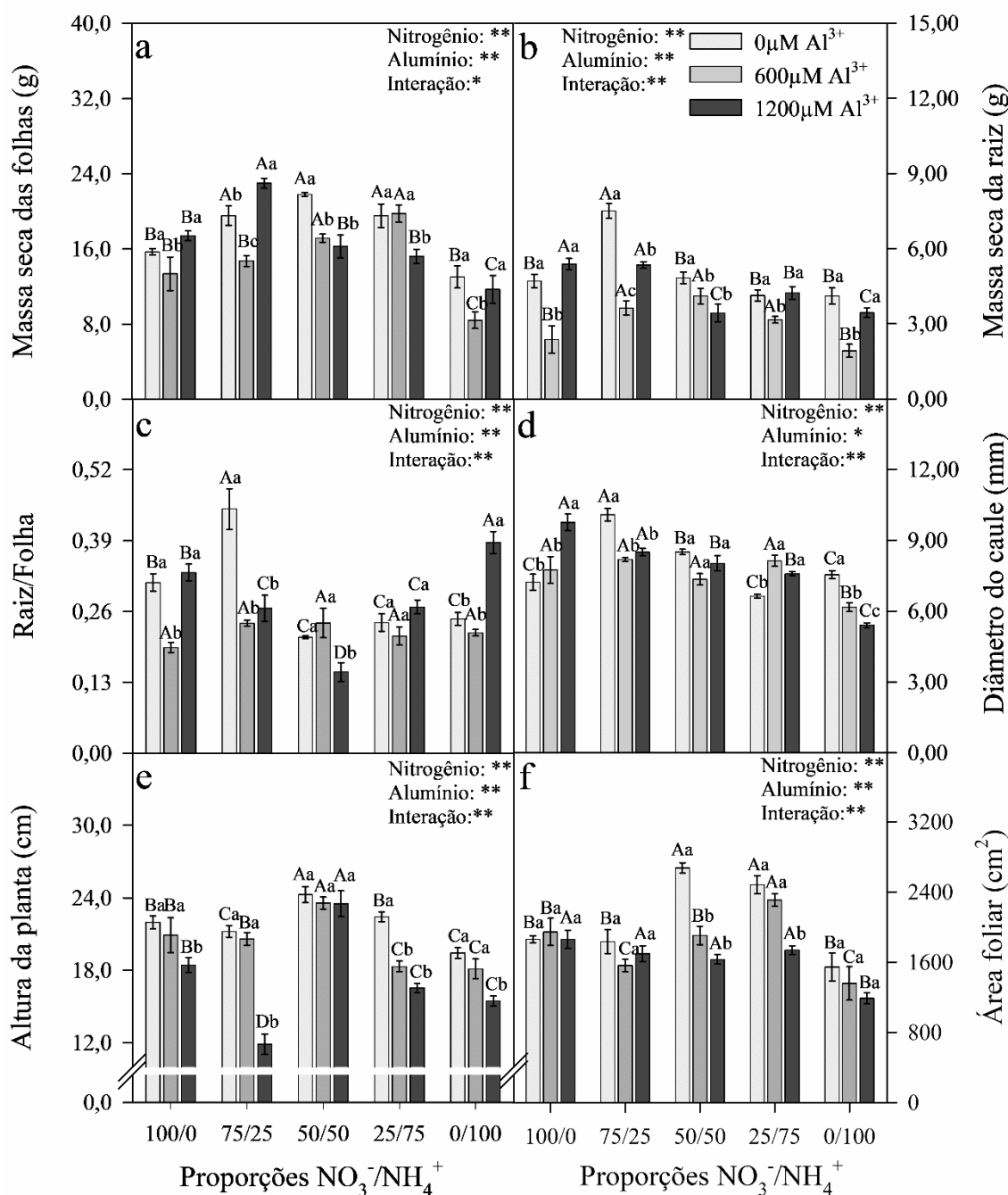
No geral, o aumento na concentração de  $\text{NH}_4^+$  na solução nutritiva levou a menores diâmetros do caule, principalmente sob a concentração de  $1200\mu\text{M Al}^{3+}$ . Nas proporções de 100/0 e 25/75  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ , a exposição das plantas às diferentes concentrações de alumínio resultou no aumento do diâmetro do caule. Por outro lado, nas proporções de 75/50 e 0/100  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  a presença do alumínio na solução nutritiva exerceu efeito negativo sobre o diâmetro do caule dessa espécie (FIGURA 12d).

Analisando o efeito das diferentes proporções de  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  sobre a altura da parte aérea, pode-se perceber um maior crescimento das mudas de *Z. tuberculosa* tratadas com a proporção 50/50, independente da concentração de alumínio na solução nutritiva. Quando foi avaliado o efeito do alumínio em cada proporção de  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  separadamente, foi observado que na maioria das proporções de  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  o alumínio exerceu um efeito negativo sobre o crescimento da parte aérea, exceto na proporção de 50/50  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  (FIGURA 12e).

Quando não expostas ao alumínio, a área foliar das plantas foi em média 32% maior nas proporções de 50/50 e 25/75 em relação às demais proporções. Já sob o tratamento de  $600\mu\text{M Al}^{3+}$ , apenas a proporção de 25/75 resultou no aumento da área foliar dessa espécie. Enquanto, quando submetidas ao tratamento de  $1200\mu\text{M Al}^{3+}$  todas as proporções de  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  mantiveram a área foliar iguais, exceto no tratamento em que o  $\text{NH}_4^+$  foi a única fonte de nitrogênio. Com relação ao efeito do alumínio em cada proporção de  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ , pode-se observar que nas proporções de 50/50 e 25/75 a presença desse metal diminuiu a área foliar das plantas avaliadas (FIGURA 12f).



Figura 12 – Valores de massa seca das folhas (a), massa seca da raiz (b), razão massa seca raiz/folha (c), diâmetro do caule (d), altura da planta (e) e área foliar (f) de plantas jovens de *Z. tuberculosa* sob diferentes proporções de  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  e doses de alumínio. Letras maiúsculas indicam diferenças significativas entre as proporções de  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ , e letras minúsculas mostram diferenças significativas entre as doses de alumínio com base na média (n=10) comparada pelo teste de Scott-Knott ( $P < 0,05$ ). Erro padrão representado no ápice das barras.



#### Acúmulo de nitrato, amônio e nitrogênio total em folhas e raízes de *Z. tuberculosa*

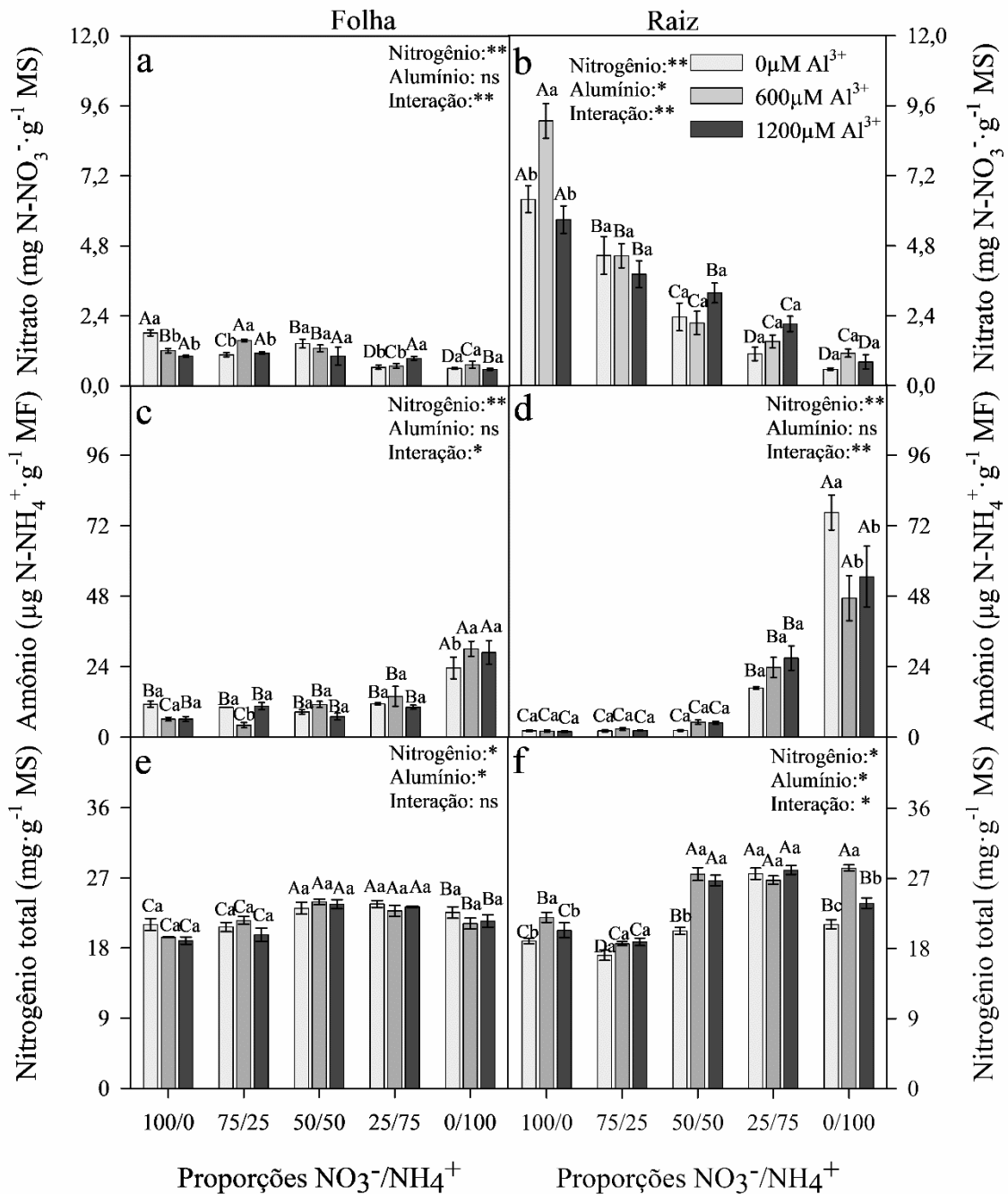
O teor de  $\text{NO}_3^-$ , no geral, diminuiu proporcionalmente conforme as concentrações de  $\text{NO}_3^-$  foram diminuindo na solução nutritiva em folhas de *Z. tuberculosa*, principalmente sob as

concentrações de 0 e 600 $\mu$ M Al<sup>3+</sup>. A presença de alumínio aumentou a concentração de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> nas folhas sob as proporções de nitrogênio 75/25 e 25/75 sob 600 $\mu$ M Al<sup>3+</sup> e 1200 $\mu$ M Al<sup>3+</sup>, respectivamente (FIGURA 13a). Nas raízes, os níveis de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> também diminuíram gradativamente conforme a proporção NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/NH<sub>4</sub><sup>+</sup> foi reduzida em cada tratamento. Porém, sob a proporção 100/0, a concentração de 600 $\mu$ M Al<sup>3+</sup> resultou em um maior acúmulo de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> nas raízes dessa espécie (FIGURA 13b).

O acúmulo de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> nas folhas de *Z. tuberculosa* também foi progressivo seguindo o aumento na concentração de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> nas soluções nutritivas. As plantas que receberam NH<sub>4</sub><sup>+</sup> como única fonte de nitrogênio apresentaram um aumento significativo em relação às demais proporções NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. A concentração de 600 $\mu$ M Al<sup>3+</sup> associada a proporção 75/25 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/NH<sub>4</sub><sup>+</sup> levou a diminuição de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> nas folhas. Enquanto, em plantas que NH<sub>4</sub><sup>+</sup> como única fonte de nitrogênio foi associado à presença do alumínio houve um aumento de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> nas folhas em comparação às plantas que receberam essa mesma fonte de nitrogênio e não foram submetidas a contaminação com alumínio (FIGURA 13c). Nas raízes a presença do NH<sub>4</sub><sup>+</sup> foi significativamente maior nas proporções de 25/75 e 0/100 de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. Podendo-se observar uma diminuição no acúmulo de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> nas raízes das plantas que receberam 100/0 de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e foram expostas ao alumínio (FIGURA 13d).

Os teores de nitrogênio total não diferiram nas folhas das plantas submetidas às diferentes concentrações de alumínio. Todavia, as plantas que foram tratadas com maiores proporções NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/NH<sub>4</sub><sup>+</sup> apresentaram menor acúmulo de nitrogênio em suas folhas (FIGURA 13e). O padrão de menor acúmulo de nitrogênio nos tratamentos com maior disponibilidade de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> em relação ao NH<sub>4</sub><sup>+</sup> também foi observado nas raízes. Já a ação do alumínio nesse órgão diferiu das folhas, pois sob a proporção de 100/0 de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/NH<sub>4</sub><sup>+</sup> a concentração de 600 $\mu$ M Al<sup>3+</sup> levou ao maior acúmulo desse nutriente nas raízes. Já nas proporções de 50/50 e 0/100 de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/NH<sub>4</sub><sup>+</sup> ambas as concentrações de alumínio utilizadas levaram ao aumento de nitrogênio nas raízes, sendo esse aumento mais proeminente na concentração de 600 $\mu$ M Al<sup>3+</sup> sob NH<sub>4</sub><sup>+</sup> como fonte única de nitrogênio (FIGURA 13f).

Figura 13 – Teores de nitrato (a e b), amônio (c e d) e nitrogênio total (e e f) em folhas e raízes de plantas jovens de *Z. tuberculosa* sob diferentes proporções de  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  e doses de alumínio. Letras maiúsculas indicam diferenças significativas entre as proporções de  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ , e letras minúsculas mostram diferenças significativas entre as doses de alumínio com base na média ( $n=10$ ) comparada pelo teste de Scott-Knott ( $P < 0,05$ ). Erro padrão representado no ápice das barras.



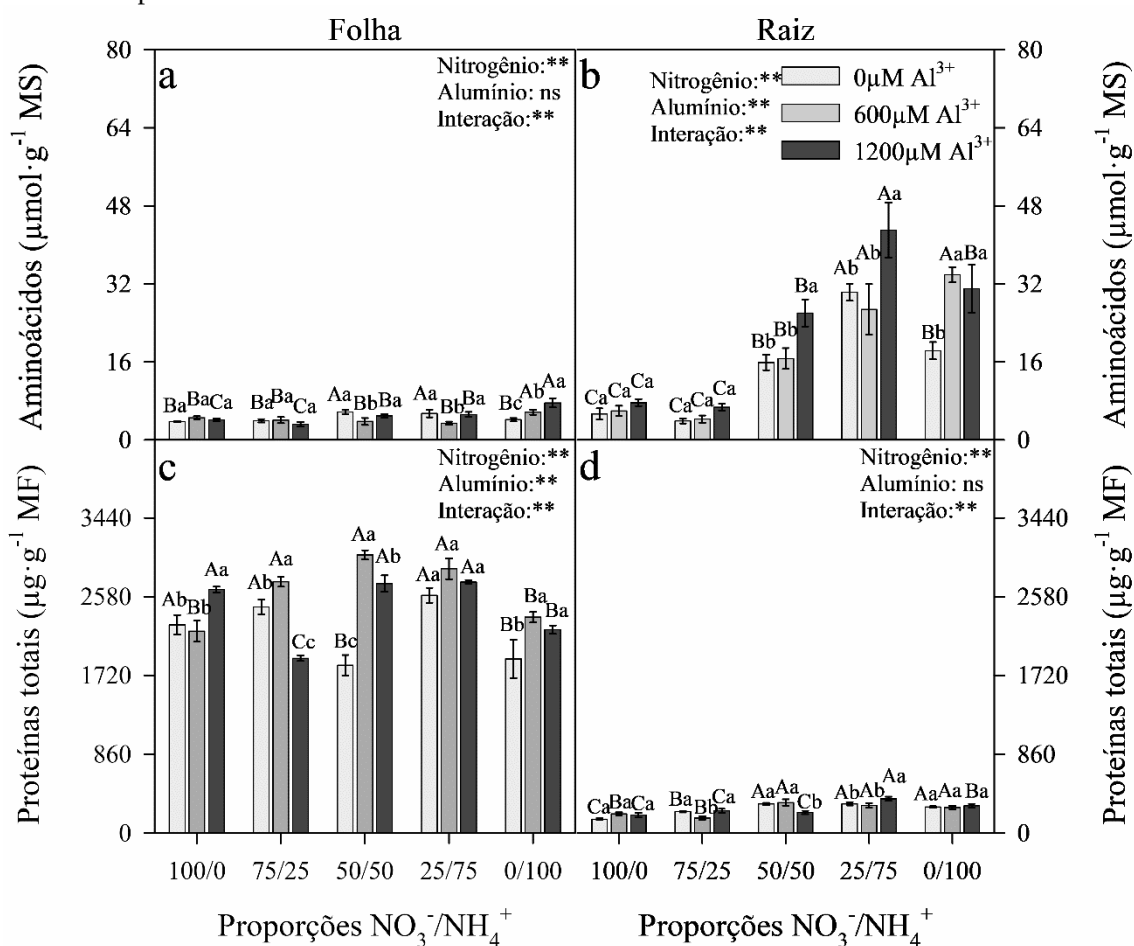
Fonte: Da autora (2023)

#### Teor de aminoácidos e proteínas em folhas e raízes de *Z. tuberculosa*

As diferentes proporções de  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  afetaram a síntese de aminoácidos nas plantas de *Z. tuberculosa*. Houve maior acúmulo de aminoácidos nas folhas das plantas sob maior

concentração de  $\text{NH}_4^+$  em relação ao  $\text{NO}_3^-$ . Porém, quando associado à concentração de  $600\mu\text{M}$   $\text{Al}^{3+}$ , os teores de aminoácidos diminuíram nos tratamentos de 50/50 e 25/75  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ . Enquanto que, sob  $\text{NH}_4^+$  como fonte única de nitrogênio, o aumento nas doses de alumínio levou ao aumento no acúmulo de aminoácidos nas folhas (FIGURA 14a). Nas raízes, houve um aumento significativo nos teores de aminoácidos em resposta a maior disponibilidade de  $\text{NH}_4^+$  nos tratamentos. A presença do alumínio elevou o nível de aminoácidos nas raízes a partir do tratamento 50/50  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  (FIGURA 14b).

Figura 14 – Teores de aminoácidos (a e b) e proteínas totais (c e d) em folhas e raízes de plantas jovens de *Z. tuberculosa* sob diferentes proporções de  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  e doses de alumínio. Letras maiúsculas indicam diferenças significativas entre as proporções de  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ , e letras minúsculas mostram diferenças significativas entre as doses de alumínio com base na média (n=10) comparada pelo teste de Scott-Knott ( $P < 0,05$ ). Erro padrão representado no ápice das barras.



Fonte: Da autora (2023)

O acúmulo de proteínas totais em folhas de *Z. tuberculosa* foi alto na ausência de alumínio sob 100/0, 75/25 e 25/75  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ . No geral, a presença do alumínio levou ao maior acúmulo de proteínas nas folhas em todas as proporções de  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ . Exceto na proporção 75/25  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ , onde a concentração de  $1200\mu\text{M}$   $\text{Al}^{3+}$  levou ao decréscimo de proteínas e na proporção de 25/75  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ , em que não houve diferença entre os diferentes tratamentos

com alumínio (FIGURA 14c). Nas raízes, o teor de proteínas totais subiu gradativamente seguindo o aumento na concentração de  $\text{NH}_4^+$  nos tratamentos. Alguns tratamentos submetidos a contaminação por alumínio resultaram na diminuição nos teores de proteínas nas raízes de *Z. tuberculosa*, como o observado na proporção de 75/25  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  sob  $600\mu\text{M Al}^{3+}$  e na proporção 50/50  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  sob  $1200\mu\text{M Al}^{3+}$ . Em contrapartida, sob a proporção de 25/75  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  o efeito da dose  $1200\mu\text{M Al}^{3+}$  foi positiva sobre o acúmulo de proteínas (FIGURA 14d).

*Atividade das enzimas do metabolismo do nitrogênio em folhas e raízes de Z. tuberculosa*

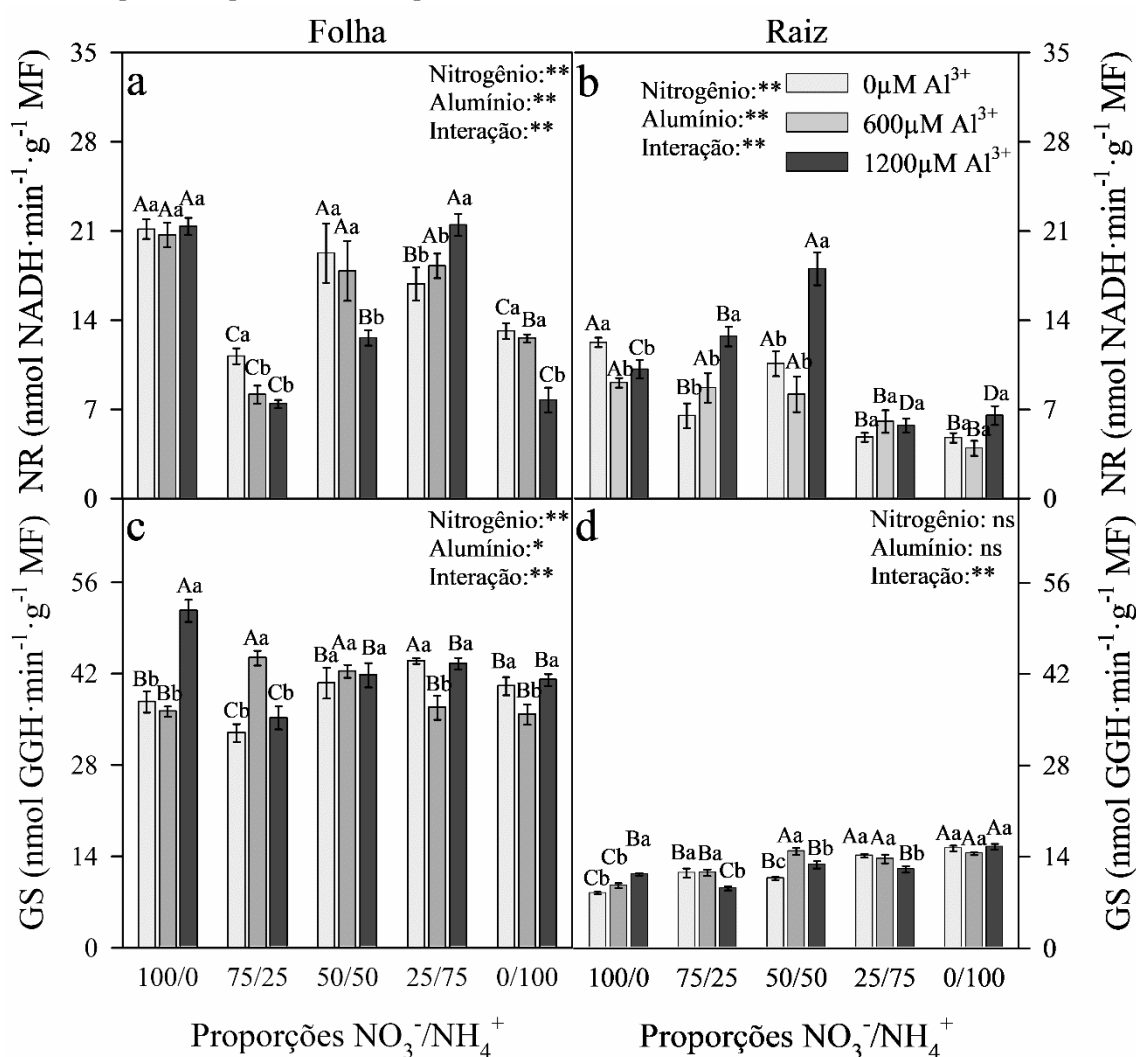
A menor atividade da enzima NR em folhas de *Z. tuberculosa* foi observada nas proporções 75/25 e 0/100  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ . Exceto quando as plantas foram submetidas a  $600\mu\text{M Al}^{3+}$ , em que apenas a proporção de 75/25 resultou em uma diminuição na atividade dessa enzima. Com relação ao efeito do alumínio sobre a atividade da NR em cada proporção de  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ , nas proporções 75/25, 50/50 e 0/100  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  esse metal exerceu um efeito deletério sobre a NR. Por outro lado, na proporção de 25/75  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ , a presença do alumínio na solução nutritiva levou ao aumento na atividade da NR (FIGURA 15a).

Nas raízes, a menor atividade da NR ocorreu nas proporções de 25/75 e 0/100 em todas as concentrações de alumínio. Porém, na proporção de 75/25 também foi observado uma menor atividade dessa enzima na ausência de alumínio. Sob fonte única de nitrogênio com  $\text{NO}_3^-$ , o alumínio exerceu um efeito negativo sobre a atividade da NR. Porém nas proporções de 75/25 e 50/50  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  o efeito do alumínio foi benéfico para a atividade dessa enzima, com aumento de 48,9% e 41,3%, respectivamente, sob a concentração de  $1200\mu\text{M Al}^{3+}$  em relação aos tratamentos sem alumínio nessas mesmas proporções de  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  (FIGURA 15b).

Quanto a atividade da GS, em folhas a ação dessa enzima foi maior na proporção de 25/75  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  na ausência de alumínio. Sob a concentração de  $600\mu\text{M Al}^{3+}$  a maior atividade dessa enzima ocorreu nas proporções de 75/25 e 50/50  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ , enquanto na concentração de  $1200\mu\text{M Al}^{3+}$  o tratamento com  $\text{NO}_3^-$  como única fonte de nitrogênio apresentou a maior atividade da GS. Sob maiores concentrações de  $\text{NO}_3^-$ , diferentes doses de alumínio tiveram efeito positivo na atividade da GS, havendo aumento na sua atividade sob as  $1200\mu\text{M Al}^{3+}$  e  $600\mu\text{M Al}^{3+}$  nas proporções de 100/0 e 75/25  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ , respectivamente. Por outro lado, quando as plantas estavam sob maior concentração de  $\text{NH}_4^+$ , a dose de  $600\mu\text{M Al}^{3+}$  afetou negativamente a atividade da GS (FIGURA 15c).

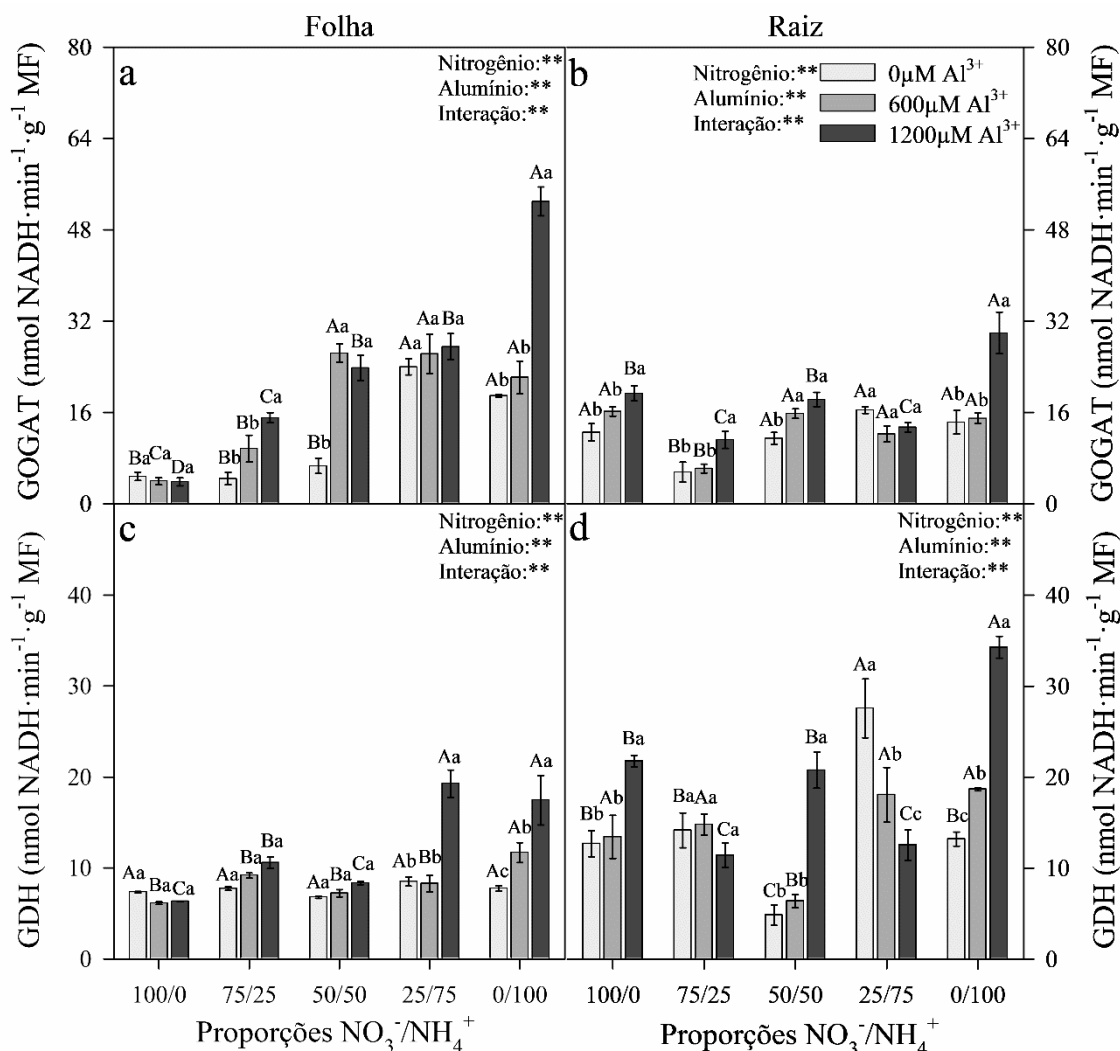
Nas raízes, maiores concentrações de  $\text{NH}_4^+$  levaram ao aumento gradual na atividade da GS sob todas as doses de alumínio. Nas proporções de 100/0 e 50/50  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  a presença do alumínio na solução nutritiva levou ao aumento na atividade da GS. Por outro lado, sob 75/25 e 25/75  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ , o efeito do alumínio sobre a atividade dessa enzima foi negativo (FIGURA 15d).

Figura 15 – Atividade da NR - nitrato redutase (a e b) e GS - glutamina sintetase (c e d) em folhas e raízes de plantas jovens de *Z. tuberculosa* sob diferentes proporções de  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  e doses de alumínio. Letras maiúsculas indicam diferenças significativas entre as proporções de  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ , e letras minúsculas mostram diferenças significativas entre as doses de alumínio com base na média ( $n=10$ ) comparada pelo teste de Scott-Knott ( $P < 0,05$ ). Erro padrão representado no ápice das barras.



A atividade da GOGAT nas folhas de *Z. tuberculosa* aumentou gradualmente seguindo o aumento na concentração do  $\text{NH}_4^+$ , principalmente sob 1200 $\mu\text{M}$   $\text{Al}^{3+}$ . Os tratamentos com alumínio levaram ao aumento na atividade da GOGAT nas proporções de 75/25, 50/50 e 0/100  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ , sendo o aumento mais proeminente observado na concentração 1200 $\mu\text{M}$   $\text{Al}^{3+}$  sob  $\text{NH}_4^+$  como fonte única de nitrogênio (FIGURA 16a).

Figura 16 – Atividade da NADH-GOGAT - glutamato sintase dependente de NADH (a e b) e GDH - glutamato desidrogenase (c e d) em folhas e raízes de plantas jovens de *Z. tuberculosa* sob diferentes proporções de  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  e doses de alumínio. Letras maiúsculas indicam diferenças significativas entre as proporções de  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ , e letras minúsculas mostram diferenças significativas entre as doses de alumínio com base na média ( $n=10$ ) comparada pelo teste de Scott-Knott ( $P < 0,05$ ). Erro padrão representado no ápice das barras.



Fonte: Da autora (2023)

A proporção de  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  em que houve, no geral, a menor atividade da GOGAT nas raízes das plantas sob 75/25  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ . Em todas as proporções de  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  a presença do alumínio teve efeito positivo na atividade da GOGAT, exceto sob 25/75  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  (FIGURA 16b).

Nas folhas de *Z. tuberculosa*, a atividade da GDH não diferiu entre as diferentes proporções de  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  na ausência de alumínio. Porém, sob as diferentes concentrações de alumínio e alta concentração de  $\text{NH}_4^+$ , a atividade da GDH foi estimulada. Nas proporções de 25/75 e 0/100  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ , a presença do alumínio induziu a maior atividade da GDH (FIGURA 16c).

Nas raízes, o comportamento na atividade da GDH foi variado. Na ausência de alumínio, a atividade dessa enzima foi maior na proporção de 25/75  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  e menor sob 50/50  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ . Sob a concentração de 600 $\mu\text{M}$   $\text{Al}^{3+}$ , a proporção de 50/50  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  levou a decréscimo na atividade da GDH. Enquanto que, sob 1200 $\mu\text{M}$   $\text{Al}^{3+}$ , houve alta atividade dessa enzima nas plantas que receberam  $\text{NH}_4^+$  como fonte única de nitrogênio e as menores atividades foram observadas sob as proporções de 75/25 e 25/75  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ . A única proporção de  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  em que foi observado efeito deletério do alumínio sobre a atividade da GDH foi em 25/75  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  (FIGURA 16d).

#### *Metabolismo do carbono em Z. tuberculosa*

Avaliando os teores de pigmentos fotossintéticos, foi observado, no geral, um acúmulo de carotenoides, clorofila a e clorofila b nas folhas de *Z. tuberculosa* sob as proporções intermediárias de  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  (FIGURA 17). Na ausência de alumínio, o teor de carotenoide foi menor em plantas que receberam o  $\text{NO}_3^-$  como fonte única de nitrogênio. Sob a concentração de 600 $\mu\text{M}$   $\text{Al}^{3+}$ , as proporções de 100/0 e 0/100 de  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  levaram ao menor acúmulo de carotenoides. Por outro lado, os maiores teores desse pigmento em folhas de plantas tratadas com 1200 $\mu\text{M}$   $\text{Al}^{3+}$  ocorreu nas proporções de 75/25 e 50/50  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ . Sob  $\text{NO}_3^-$  como fonte única de nitrogênio, a concentração de 1200 $\mu\text{M}$   $\text{Al}^{3+}$  levou ao aumento de carotenoides. Por outro lado, quando o  $\text{NH}_4^+$  foi a fonte de nitrogênio na solução nutritiva, o efeito do alumínio em ambas as concentrações foi negativa sobre o teor de carotenoides (FIGURA 17a).

Na ausência de alumínio, o maior teor de clorofila b foi observado nas plantas nutridas com 50/50  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ . Quando exposta à concentração de 600 $\mu\text{M}$   $\text{Al}^{3+}$ , as proporções de 75/25 e 50/50  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  foram as que levaram ao maior acúmulo desse pigmento. Enquanto que na concentração máxima de alumínio utilizada, as proporções de 75/25 e 25/75  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  foram as que mais acumularam clorofila b. Sob maiores proporções de  $\text{NO}_3^-$  em relação ao  $\text{NH}_4^+$  ambas concentrações de alumínio resultaram no aumento do teor de clorofila b. No entanto, quando a proporção de 50/50  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  foi utilizada, a presença de alumínio na solução nutritiva agiu negativamente sobre a o acúmulo desse pigmento (FIGURA 17b).

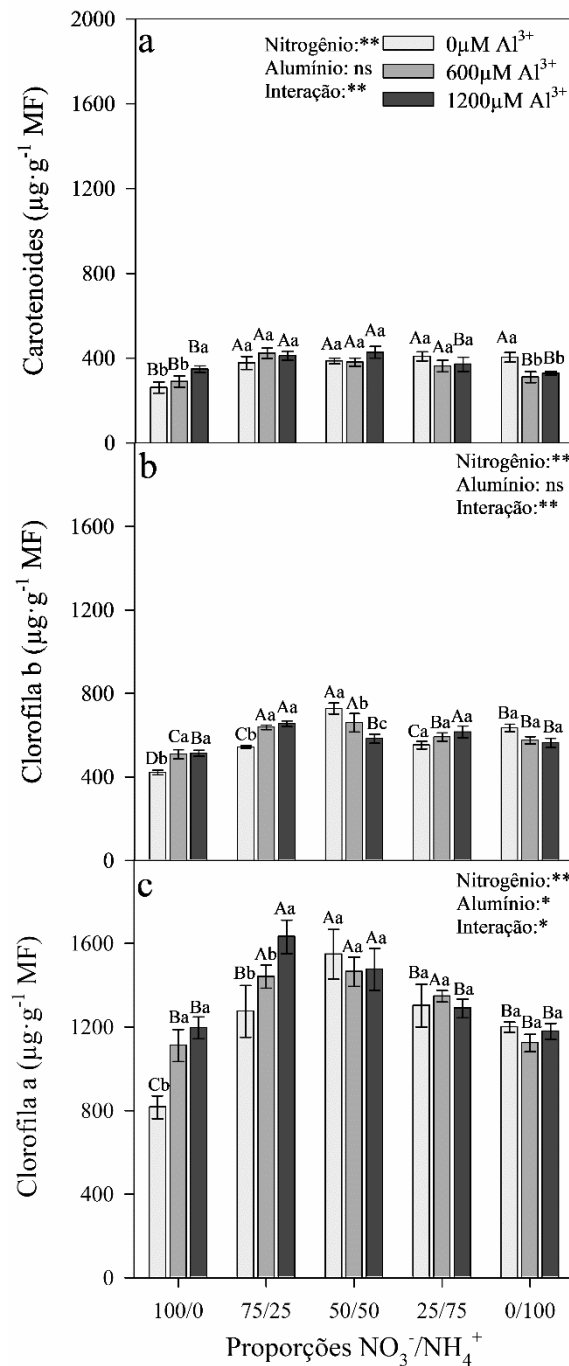
O teor de clorofila a nas folhas de *Z. tuberculosa* seguiu um padrão de aumento até a proporção de 50/50  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ , havendo um decréscimo nas proporções com maiores concentrações de  $\text{NH}_4^+$ . Nas proporções com maior disponibilidade de  $\text{NO}_3^-$  (100/0 e 75/25  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ ), a presença do alumínio levou ao aumento de clorofila a nas folhas da espécie em estudo (FIGURA 17c).



Em complemento aos resultados obtidos com as análises dos pigmentos fotossintéticos, também foram analisados os teores de açúcares redutores (AR), açúcares solúveis totais (AST) e amido (FIGURA 18). A maior concentração de AR nas folhas de *Z. tuberculosa* na ausência de alumínio foi observada sob a proporção 25/75  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ . Quando submetida a concentração 600 $\mu\text{M}$   $\text{Al}^{3+}$ , os maiores valores obtidos foram nas proporções 75/25 e 50/50  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ . Enquanto sob 1200 $\mu\text{M}$   $\text{Al}^{3+}$ , o teor de AR aumentou gradualmente até chegar à maior concentração observada sob 0/100  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ . Sob  $\text{NO}_3^-$  como fonte única de nitrogênio, a concentração de 600 $\mu\text{M}$   $\text{Al}^{3+}$  levou à diminuição nos teores de AR nas folhas. Todavia, nas proporções de 75/025 e 50/50  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ , a concentração de 600 $\mu\text{M}$   $\text{Al}^{3+}$  levou ao aumento na concentração de AR. Quando nutridos com 75/25  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  as concentrações de alumínio utilizadas levaram a diminuição no acúmulo de AR. Enquanto, sob  $\text{NH}_4^+$  como única fonte de nitrogênio, os valores de AR aumento sob a concentração de 1200 $\mu\text{M}$   $\text{Al}^{3+}$  (FIGURA 18a).

Nas raízes de *Z. tuberculosa*, o  $\text{NO}_3^-$  como fonte única de nitrogênio foi responsável pelo menor teor de AR na ausência de alumínio ou sob a concentração 600 $\mu\text{M}$   $\text{Al}^{3+}$ . Já na concentração de 1200 $\mu\text{M}$   $\text{Al}^{3+}$  e proporção de 25/75  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  houve o maior teor de AR. Na proporção de 100/0  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  a adição de alumínio levou ao aumento do AR nas raízes. Por outro lado, adição de alumínio às proporções de 75/25, 50/50 e 0/100  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  levaram à diminuição nos teores desses açúcares. Enquanto, sob a proporção de 25/75  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  a concentração de 600 $\mu\text{M}$   $\text{Al}^{3+}$  levou a diminuição no teor de AR nas raízes (FIGURA 18b).

Figura 17 – Teores de carotenoides (a), clorofila a (b) e clorofila b (c) em folhas de plantas jovens de *Z. tuberculosa* sob diferentes proporções de  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  e doses de alumínio. Letras maiúsculas indicam diferenças significativas entre as proporções de  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ , e letras minúsculas mostram diferenças significativas entre as doses de alumínio com base na média (n=10) comparada pelo teste de Scott-Knott ( $P < 0,05$ ). Erro padrão representado no ápice das barras.



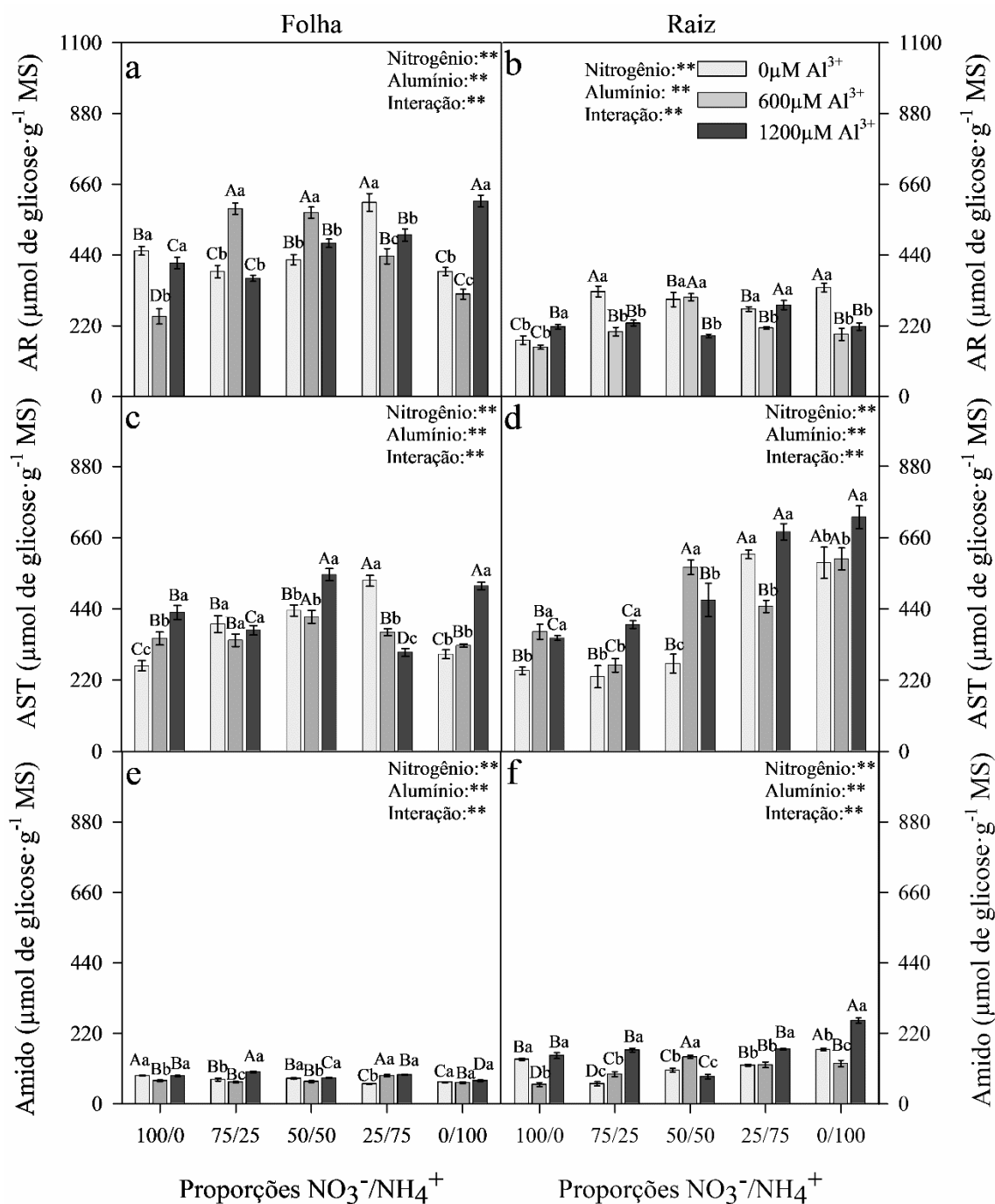
Os teores de AST aumentaram em folhas de *Z. tuberculosa* na ausência de alumínio, quando houve diminuição nas proporções  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ . Porém, sob  $\text{NH}_4^+$  como fonte única de nitrogênio houve queda no teor de AST nas folhas dessa espécie. Quando submetidas a

concentração de  $600\mu\text{M Al}^{3+}$ , o aumento nos níveis de AST seguiu a diminuição nas proporções de  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  até o tratamento 50/50, a partir do qual houve um decréscimo até o tratamento 0/100  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ . Sob a concentração de  $1200\mu\text{M Al}^{3+}$ , os teores de AST flutuaram entre as diferentes proporções de  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ , havendo os maiores valores nos tratamentos 50/50 e 0/100  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  (FIGURA 18c). Sob as proporções de 100/0, 50/50 e 0/100  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ , a presença do alumínio levou ao aumento nos níveis de AST nas folhas. Por outro lado, na proporção de 25/75 o efeito do alumínio sobre o teor de AST foi negativo (FIGURA 18c).

Nas raízes de *Z. tuberculosa*, em todas as concentrações de alumínio, o aumento na disponibilidade de  $\text{NH}_4^+$  levou ao maior acúmulo de AST. Sob todas as proporções de  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ , a presença do alumínio resultou no maior acúmulo de AST nas raízes, exceto sob a proporção de 25/75 onde o tratamento com  $600\mu\text{M Al}^{3+}$  levou a diminuição nos teores desses açúcares (FIGURA 18d).

Na ausência de alumínio, o aumento na concentração de  $\text{NH}_4^+$  na solução nutritiva levou a menores níveis de amido em folhas de *Z. tuberculosa*. Quando expostas a  $600\mu\text{M Al}^{3+}$ , os níveis de amido aumentaram na proporção de 25/75  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ . Enquanto, o maior valor para essa molécula sob a concentração de  $1200\mu\text{M Al}^{3+}$  foi observado no tratamento com 75/25  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ . Nas proporções de 100/0 e 50/50, a concentração de  $600\mu\text{M Al}^{3+}$  levou a diminuição no teor amido nas folhas. Enquanto, nos tratamentos 75/25 e 25/75  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ , o aumento na concentração de alumínio resultou no maior acúmulo de amido (FIGURA 18e).

Figura 18 – Teor de AR - açúcares redutores (a e b), AST - açúcares solúveis totais (a e d) e amido (e e f) em folhas e raízes de plantas jovens de *Z. tuberculosa* sob diferentes proporções de  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  e doses de alumínio. Letras maiúsculas indicam diferenças significativas entre as proporções de  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ , e letras minúsculas mostram diferenças significativas entre as doses de alumínio com base na média ( $n=10$ ) comparada pelo teste de Scott-Knott ( $P < 0,05$ ). Erro padrão representado no ápice das barras.



Com relação ao teor de amido nas raízes, as plantas que não foram submetidas à contaminação por alumínio tiveram um aumento gradual no teor de amido do tratamento 75/25 ao 0/100. Quando expostas ao tratamento de  $1200\mu\text{M Al}^{3+}$ , o aumento no teor de amido se deu a partir do tratamento de 100/0 até o 50/50, seguido de decréscimo e estabilização a partir do

tratamento 25/75. Sob a concentração  $1200\mu\text{M Al}^{3+}$ , o menor teor de amido observado em raízes de *Z. tuberculosa* foi na proporção de 50/50 e a maior em 0/100. No tratamento com 100/0, a concentração de  $600\mu\text{M Al}^{3+}$  levou ao decréscimo no teor de amido. Já sob 75/25, 50/50 e 25/75, o efeito do alumínio em diferentes doses foi positivo sobre o acúmulo de amido. Enquanto, na proporção de 0/100 a concentração de  $600\mu\text{M Al}^{3+}$  levou a uma diminuição de 25,9% e a dose de  $1200\mu\text{M Al}^{3+}$  elevou em 34,8% o teor de amido em relação à concentração ao tratamento sem alumínio (FIGURA 18f).

#### *Sistema antioxidante*

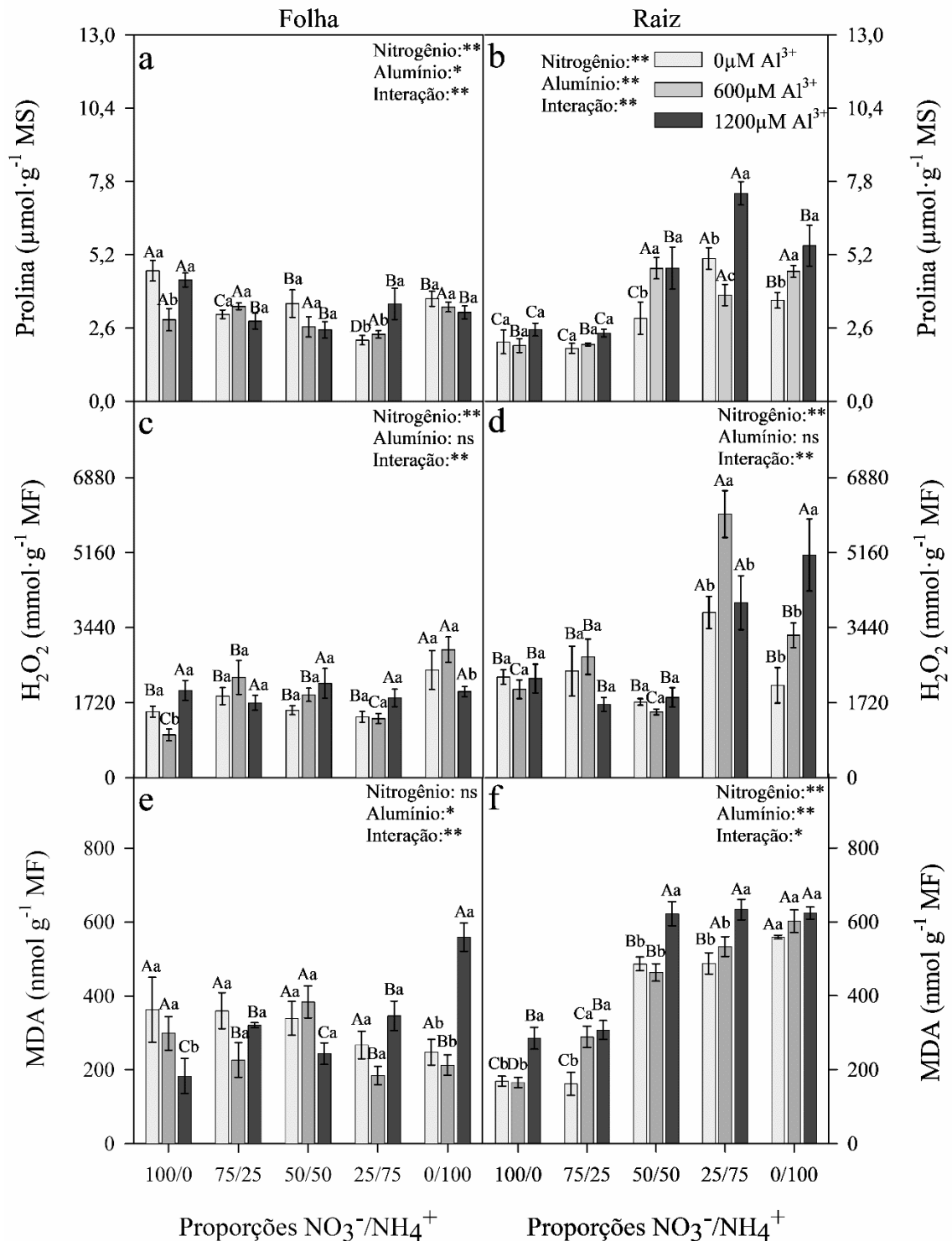
O sistema antioxidante em *Z. tuberculosa* também foi estudado e os resultados demonstram que os tratamentos empregados nesse trabalho afetaram a homeostase redox dessa espécie (FIGURAS 19 e 20). Nos tratamentos que não possuíam alumínio ou que receberam  $1200\mu\text{M Al}^{3+}$ , o teor de prolina foi maior nas folhas de plantas que receberam  $\text{NO}_3^-$  como fonte única de nitrogênio. Já sob  $600\mu\text{M Al}^{3+}$ , não houve diferença entre as proporções de  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ . Em plantas que receberam  $\text{NO}_3^-$  como fonte única de nitrogênio, a proporção de  $600\mu\text{M Al}^{3+}$  levou a diminuição do teor de prolina nas folhas. Enquanto, na proporção de 25/75  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  concentração de  $1200\mu\text{M Al}^{3+}$  levou ao aumento desse metabólito nas plantas (FIGURA 19a). Nas raízes, o aumento na concentração de  $\text{NH}_4^+$  na solução nutritiva levou a maiores teores de prolina, independente do tratamento com alumínio. Porém, sob as proporções de 50/50 a 0/100 o efeito desse metal gerou uma diminuição nos teores de prolina (19b).

As maiores concentrações de  $\text{H}_2\text{O}_2$  nas folhas de *Z. tuberculosa* sob  $0\mu\text{M}$  e  $600\mu\text{M Al}^{3+}$  foram observadas na proporção de 0/100  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ , enquanto os menores teores dessa molécula sob  $600\mu\text{M Al}^{3+}$  foram observadas nas proporções de 100/0 e 25/75. Na proporção de 100/0 o tratamento com  $600\mu\text{M Al}^{3+}$  levou diminuição do  $\text{H}_2\text{O}_2$  nas folhas. Por outro lado, sob 0/100, a concentração de  $1200\mu\text{M Al}^{3+}$  que levou a diminuição no teor dessa molécula nesse órgão (FIGURA 19c).

A maior proporção de  $\text{NH}_4^+$  em relação ao  $\text{NO}_3^-$  na solução nutritiva elevou o teor de  $\text{H}_2\text{O}_2$  nas raízes de *Z. tuberculosa*. Na proporção de 25/75 o tratamento com  $600\mu\text{M Al}^{3+}$  foi responsável elevar em 37% a concentração de  $\text{H}_2\text{O}_2$  nas raízes dessa espécie em relação às plantas livres de alumínio. Por outro lado, na proporção de 0/100 o aumento do  $\text{H}_2\text{O}_2$  só foi observado sob o tratamento com  $1200\mu\text{M Al}^{3+}$  (FIGURA 19d).

Figura 19 – Teores de prolina (a e b),  $\text{H}_2\text{O}_2$  - peróxido de hidrogênio (c e d) e MDA-malondialdeído (e e f) em folhas e raízes de plantas jovens de *Z. tuberculosa* sob diferentes proporções de  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  e doses de alumínio. Letras maiúsculas indicam diferenças significativas entre as proporções de  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ , e letras minúsculas mostram diferenças significativas entre as

doses de alumínio com base na média (n=10) comparada pelo teste de Scott-Knott ( $P < 0,05$ ). Erro padrão representado no ápice das barras.



Fonte: Da autora (2023)

Não houve alterações significativas na peroxidação lipídica das folhas de *Z. tuberculosa* expostas a diferentes proporções de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/NH<sub>4</sub><sup>+</sup> na ausência de alumínio. Todavia, sob a concentração de 600 µM Al<sup>3+</sup>, foi observado um aumento na peroxidação lipídica nas plantas submetidas às proporções de 100/0 e 50/50 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. Quando as plantas foram expostas a 1200 µM Al<sup>3+</sup>, a proporção de 0/100 apresentou um aumento de 62% em relação às proporções

de 100/0 e 50/50  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  que apresentaram os menores níveis de peroxidação lipídica nas folhas. Na proporção de 100/0  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  o alumínio atenuou a peroxidação lipídica, enquanto na proporção de 0/100  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  o efeito desse metal levou ao aumento de MDA, evidenciando uma maior peroxidação lipídica (FIGURA 19e).

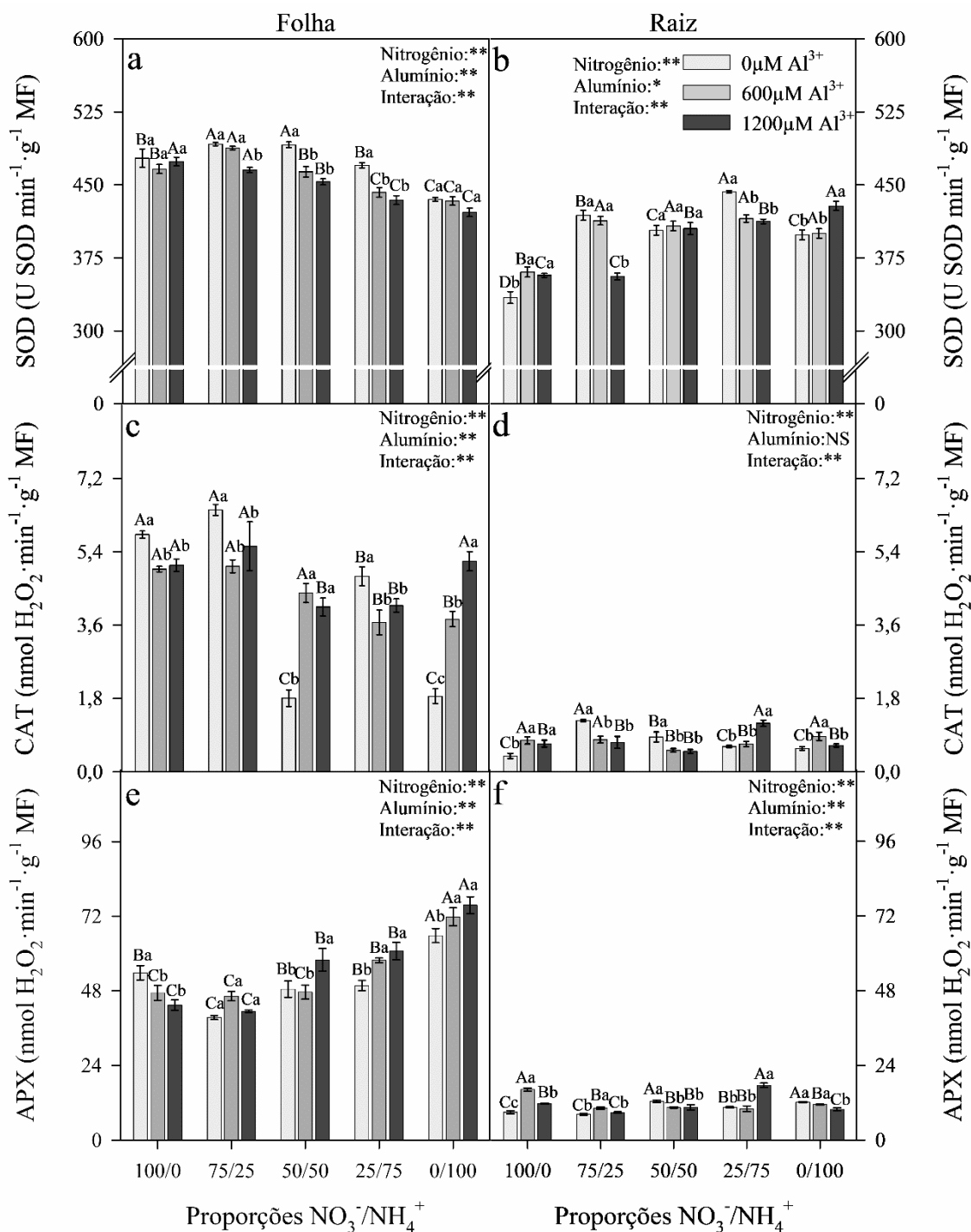
O aumento na disponibilidade do  $\text{NH}_4^+$  resultou numa elevação significativa da peroxidação lipídica nas raízes de *Z. tuberculosa* a partir da proporção de 50/50 para todas as concentrações de alumínio utilizadas. Sob diferentes proporções de  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ , o alumínio foi responsável por elevar os níveis de peroxidação lipídica nas raízes (FIGURA 19f). Importante ressaltar que os níveis de peroxidação lipídica foram mais acentuados nas raízes da espécie em estudo, quando comparado às folhas, nas proporções de 50/50, 25/75 e 0/100  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ .

Em folhas de *Z. tuberculosa*, maiores disponibilidade de  $\text{NH}_4^+$  na solução nutritiva afetou negativamente a atividade da enzima SOD em todas as concentrações de alumínio estudadas. Nos tratamentos que receberam fontes de nitrogênio mista de  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4^+$ , o alumínio afetou negativamente a atividade da SOD nas folhas dessa espécie (FIGURA 20a).

A atividade da SOD nas raízes seguiu um padrão oposto ao observado nas folhas. O aumento no teor de  $\text{NH}_4^+$  na solução nutritiva levou a maior atividade dessa enzima nas raízes. Analisando o efeito do alumínio em cada proporção de  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ , sob o fornecimento misto de  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4^+$ , esse metal afetou negativamente a atividade da SOD nas raízes da espécie em estudo (FIGURA 20b).

No geral a atividade da CAT foi mais alta nas folhas de *Z. tuberculosa* submetidas aos tratamentos com maiores proporções de  $\text{NO}_3^-$ . Nas proporções de 100/0, 75/25 e 25/75  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ , o alumínio teve um efeito negativo sobre a atividade da CAT. Todavia, as proporções de 50/50 e 0/100  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ , a presença do alumínio na solução nutritiva aumentou a atividade da CAT nas folhas (FIGURA 20c).

Figura 20 – Atividade da SOD - superóxido dismutase (a e b), CAT - catalase (c e d) e APX - ascorbato peroxidase (e e f) em folhas e raízes de plantas jovens de *Z. tuberculosa* sob diferentes proporções de  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  e doses de alumínio. Letras maiúsculas indicam diferenças significativas entre as proporções de  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ , e letras minúsculas mostram diferenças significativas entre as doses de alumínio com base na média (n=10) comparada pelo teste de Scott-Knott ( $P < 0,05$ ). Erro padrão representado no ápice das barras.



Fonte: Da autora

Nas raízes de *Z. tuberculosa*, na ausência de alumínio na solução nutritiva, houve um aumento de 52% na atividade da CAT em plantas submetidas à proporção de 75/25  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  quando comparadas as demais. Enquanto, sob o tratamento de 1200  $\mu\text{M Al}^{3+}$ , a maior atividade



dessa enzima ocorreu nas proporções 100/0 e 75/25  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ . Quando as plantas foram submetidas a maior concentração de alumínio, a atividade da CAT em suas raízes foi 46% maior na proporção de 25/75 em relação às demais proporções de  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ . A presença do alumínio nas proporções de 100/0, 25/75 e 0/100  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  foi positiva para a atividade da CAT nas raízes. Por outro lado, sob as proporções de 75/25 e 50/50  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ , a presença desse metal diminuiu a atividade da CAT nas raízes da espécie em estudo (FIGURA 20d).

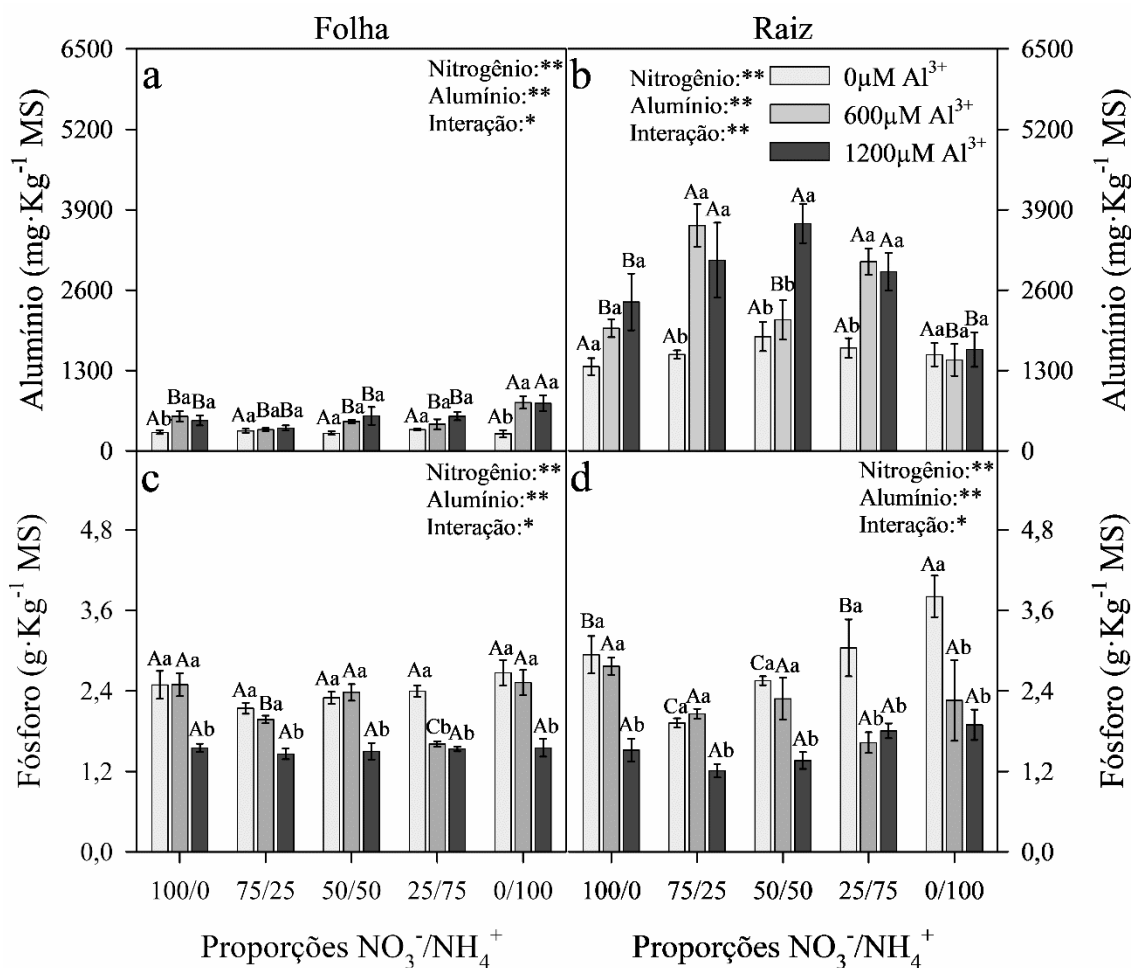
Nas folhas de *Z. tuberculosa* foi observado um padrão crescente na atividade da APX conforme houve aumento nas concentrações de  $\text{NH}_4^+$  nos tratamentos sob todas as concentrações de alumínio utilizadas. Sob  $\text{NO}_3^-$  como fonte única de nitrogênio presença do alumínio foi deletéria para a atividade da APX. Já sob as proporções de 50/50 e 25/75  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  o efeito desse metal foi positivo para a atividade dessa enzima (FIGURA 20e).

O efeito das proporções de  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  sobre a atividade da APX nas raízes foi mais complexo que nas folhas. Nas plantas que não foram tratadas com alumínio, as maiores atividades dessas enzimas ocorreram nas proporções de 50/50 e 0/100  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ . Já sob as concentrações de 600 e 1200  $\mu\text{M Al}^{3+}$ , as maiores atividades da ascorbato peroxidase foram observadas nas proporções de 100/0 e 25/75  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ , respectivamente. Nas proporções com maiores teores de  $\text{NO}_3^-$  (100/0 e 75/25  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ ), a concentração de 600  $\mu\text{M Al}^{3+}$  exerceu efeito positivo sobre a atividade da ascorbato peroxidase. Enquanto sob as proporções de 50/50 e 0/100  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ , ambas as concentrações de alumínio foram deletérias para a atividade dessa enzima. Na proporção de 25/75  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  a concentração 1200  $\mu\text{M Al}^{3+}$  elevou a atividade dessa enzima em 40% em relação as plantas nutridas com a mesma proporção na ausência de alumínio (FIGURA 20f).

#### *Acúmulo de alumínio e fósforo em folhas e raízes de Z. tuberculosa*

O acúmulo de alumínio nas folhas de *Z. tuberculosa* foi significativamente maior apenas nos tratamentos contendo  $\text{NH}_4^+$  como única fonte de nitrogênio sob 600 e 1200  $\mu\text{M Al}^{3+}$ . Todavia, as plantas nutridas apenas com  $\text{NO}_3^-$  ou  $\text{NH}_4^+$  apresentaram acúmulo de alumínio em suas folhas quando expostas a esse metal (FIGURA 21a). Com relação ao acúmulo de alumínio nas raízes, as proporções de  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  que levaram aos maiores acúmulos desse metal foram 75/25 e 25/75  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  quando expostas a 600  $\mu\text{M Al}^{3+}$ . Enquanto, sob 1200  $\mu\text{M Al}^{3+}$ , os maiores teores de alumínio foram observados sob as proporções de 75/25, 50/50 e 25/75 de  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  (FIGURA 21b).

Figura 21 – Teores de alumínio (a e b) e fósforo (c e d) em folhas e raízes de plantas jovens de *Z. tuberculosa* sob diferentes proporções de  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  e doses de alumínio. Letras maiúsculas indicam diferenças significativas entre as proporções de  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ , e letras minúsculas mostram diferenças significativas entre as doses de alumínio com base na média ( $n=10$ ) comparada pelo teste de Scott-Knott ( $P < 0,05$ ). Erro padrão representado no ápice das barras.



Fonte: Da autora (2023)

A presença do alumínio na solução nutritiva afetou a absorção de fósforo por *Z. tuberculosa* sob todas as fontes de nitrogênio. Houve diminuição no teor de fósforo nas folhas das plantas nutridas com as proporções intermediárias de 75/25 e 25/75  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  e expostas a 600  $\mu\text{M}$   $\text{Al}^{3+}$  (FIGURA 21c). A concentração de 1200  $\mu\text{M}$   $\text{Al}^{3+}$  teve o maior efeito sobre acúmulo desse nutriente, mantendo os níveis de fósforo baixo nas folhas em todas as diferentes proporções de  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  (FIGURA 21c). Nas raízes das plantas livres de alumínio, o aumento na proporção de  $\text{NH}_4^+$  atuou levando a maior absorção de fósforo. O teor de fósforo também foi afetado principalmente pela maior concentração de alumínio em todas as proporções de  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ , exceto nas proporções de 25/75 e 0/100  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  onde o efeito negativo do alumínio sobre a absorção de fósforo já pôde ser observado a partir da concentração de 600  $\mu\text{M}$   $\text{Al}^{3+}$  (FIGURA 21d).

## 5. DISCUSSÃO

Manter o balanço carbono/nitrogênio é fundamental para o funcionamento metabólico da planta (ZHENG, 2009), e o estabelecimento de uma dose adequada de nitrogênio para plantas, além de evitar gastos financeiros desnecessários, é fundamental para manter esse equilíbrio. No caso de espécies com foco na recuperação de áreas degradadas, ter esse cuidado se mostra ainda mais importante, uma vez que o manejo adequado do nitrogênio no solo é fundamental para que as plantas acumulem biomassa e, dessa forma, possam mitigar os efeitos da alta disponibilidade de CO<sub>2</sub> na atmosfera através do sequestro de carbono (OREN *et al.* 2001; WIEDER *et al.* 2015; WANG *et al.* 2017a). Nesse estudo foi observado que em *Z. tuberculosa* exposta a maiores teores de nitrogênio, os valores de biomassa nas folhas em relação a raiz foram maiores (FIGURA 3).

Assim como o teor de biomassa, o crescimento primário e secundário do caule e o comprimento da raiz foi diferencialmente afetado pela baixa disponibilidade de nitrogênio ou fatores que alteram sua absorção e assimilação (FIGURA 4a,b) (FAGERIA e BALIGAR, 2001). Enquanto houve aumento na parte aérea de *Z. tuberculosa* em resposta ao aumento na disponibilidade de nitrogênio na solução nutritiva, o comprimento da raiz diminuiu sob maiores doses de nitrogênio. Menor disponibilidade de nitrogênio induz o crescimento não só da raiz principal, mas também das raízes laterais, aumentando assim, a área de absorção de nitrogênio pela planta (ZHANG; FORDE, 2000). Ademais, o NO<sub>3</sub><sup>-</sup> é reportado como uma molécula sinalizadora através da geração de assinatura de Ca<sup>2+</sup> estimulando o crescimento da raiz em *Arabidopsis* (LIU *et al.*, 2017). O maior investimento no crescimento das raízes nas plantas causa um desbalanço na repartição de fotoassimilados e, conseqüentemente, um menor crescimento da parte aérea das plantas (CASTRO MARÍN *et al.*, 2011; GAUDINIR *et al.*, 2018).

A maior área foliar em *Z. tuberculosa* sob maiores disponibilidades de nitrogênio (FIGURA 4b) é condizente com resultados já observados em outros estudos com espécies arbóreas (BRIX; EBELL, 1969; VOSE, 1988; MEIER; LEUSCHNER, 2008). A relação entre nitrogênio e área foliar é explicada pela influência desse nutriente sobre a fotossíntese de plantas (REICH e WALTERS, 1994; REICH *et al.*, 1995; PRSA *et al.*, 2007; LEWIS; FLEMING, 2016; ZHANG, ZHANG; WEN, 2018). Condições de baixa ou alta concentração de nitrogênio podem, respectivamente, aumentar ou diminuir a proporção de nitrogênio entre os sistemas não fotossintéticos e fotossintéticos, diminuindo assim a eficiência do uso de nitrogênio fotossintético e a capacidade fotossintética (QIANG *et al.*, 2023).

A partir das análises realizadas em *Z. tuberculosa* submetidas a diferentes concentrações de nitrogênio, percebeu-se que, acima de uma concentração de 10 mM N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, essa espécie

não apresenta ganho significativo no seu crescimento. Espécies com características pioneiras, como no caso de *Z. tuberculosa*, apresentam altos teores foliares de nitrogênio, bem como uma alta capacidade de resposta ao aumento na disponibilidade de nitrogênio no solo (AIDAR *et al.*, 2003), o que foi observado nesse estudo. Porém, a eficiência de uso do nitrogênio, bem como parâmetros fotossintéticos, pode diminuir com o aumento excessivo no fornecimento de nitrogênio à planta (QIANG *et al.*, 2023). Esse fenômeno foi observado em mudas de *Z. tuberculosa* fertilizadas com 16 mM N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, que apresentaram leve diminuição nos teores de nitrogênio total e nos parâmetros fotossintéticos.

O baixo teor de nitrogênio observado nas folhas e raízes de *Z. tuberculosa* no experimento 1 refletiu em menores teores de aminoácidos nessa espécie, principalmente sob os tratamentos de 2 e 4mM N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Importante ressaltar que, as diferentes disponibilidades de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> modulam diferencialmente os transportadores de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> de baixa e alta afinidade e essa regulação afeta os níveis de nitrogênio que serão absorvidos e assimilados pela planta (WANG *et al.*, 2009; IQBAL *et al.*, 2019).

O NO<sub>3</sub><sup>-</sup> regula, não só os seus transportadores, como também a atividade da NR, enzima responsável pela primeira reação de redução do NO<sub>3</sub><sup>-</sup> na planta (YANAGISAWA, 2014; YONEYAMA; SUZUKI, 2019). No experimento 1, plantas de *Z. tuberculosa* que receberam maiores concentrações de nitrogênio fornecido em forma de nitrato apresentaram maior atividade da NR em suas raízes. Todavia essa mesma resposta não foi observada em folhas dessa espécie. Esses dados indicam que, sob baixa disponibilidade de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, sua assimilação por *Z. tuberculosa* ocorre igualmente em folhas e raízes. Porém sob alta oferta de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, sua assimilação ocorre preferencialmente nas raízes.

Algumas plantas tendem transportar o NO<sub>3</sub><sup>-</sup> da raiz para parte aérea quando a atividade da NR nesse primeiro órgão não consegue assimilar todo NO<sub>3</sub><sup>-</sup> absorvido (ANDREWS, 1986). Os dados aqui obtidos também indicam que sob as condições ambientais, principalmente variação da temperatura (FIGURA 2), a qual os indivíduos de *Z. tuberculosa* foram submetidos no primeiro experimento, a raiz parece ser o órgão preferencial para assimilação de nitrogênio. Essa maior atividade da NR pelas raízes dessa espécie não foi observada nas plantas do segundo experimento, mesmo quando supridas apenas com NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, indicando que mudanças nas condições ambientais, em particular a temperatura, pode alterar o sítio preferencial de redução do NO<sub>3</sub><sup>-</sup> em *Z. tuberculosa*.

Diferentemente da NR, não houve diferenças na atividade da GS entre os tratamentos do experimento 1. É conhecido que condições de estresse modula a expressão de genes que

codificam a GS<sub>1</sub> (citossólica), aumentando a síntese e atividade dessa enzima nas plantas (LI *et al.* 2016; JI *et al.* 2019). Sendo assim, a manutenção na atividade dessa enzima em *Z. tuberculosa* sob baixa disponibilidade de nitrogênio em relação às plantas que receberam maior concentração de nitrogênio pode ser resultado de uma elevada demanda na reassimilação de nitrogênio proveniente do catabolismo de aminoácidos e proteínas. Uma vez que, a glutamina é a forma preferencial para a translocação de nitrogênio nas plantas (PRINSI; ESPEN, 2015).

O aumento na atividade da GOGAT nas folhas e raízes de *Z. tuberculosa* é condizente com a maior atividade da NR, uma vez que a atividade da primeira está intimamente relacionada à segunda (RUIZ *et al.*, 1998; RUIZ *et al.*, 1999). A maior atividade da GOGAT nas folhas em relação às raízes quando *Z. tuberculosa* foi exposta a maior disponibilidade de nitrogênio pode estar relacionado a uma maior síntese de aminoácidos por essa espécie quando exposta a condições favoráveis de oferta de nitrogênio. A alocação e armazenamento de nitrogênio nas plantas na forma de aminoácidos livres sob condições favoráveis pode ser uma estratégia eficiente para a síntese de proteínas conferindo às plantas uma rápida capacidade de ajustamento metabólico (ZHAO *et al.*, 2021).

Maior desempenho dos parâmetros fotossintéticos como teor de clorofila a, Fm', Fv'/Fm', gH<sup>+</sup> e ETR sob níveis intermediários de nitrogênio fornecido à *Z. tuberculosa*, podem ser explicados pela intrínseca relação desses parâmetros com nível ideal de nitrogênio dentro da folha. O déficit ou excesso no fornecimento de nitrogênio pode diminuir a alocação desse nutriente para o aparato fotossintético envolvido na coleta de luz, alocando-o para a formação de tecido foliar, proteínas estruturais e aumentando os níveis de nitrogênio não diretamente envolvidos na fotossíntese (QIANG *et al.*, 2023).

De modo geral, os teores de açúcares nas folhas e raízes das mudas de *Z. tuberculosa* diminuíram conforme os níveis de nitrogênio aumentava na solução nutritiva. Distúrbios na disponibilidade de nitrogênio afeta o metabolismo do carbono por meio de regulação gênica que interage com o balanço carbono/nitrogênio nas plantas (DONG *et al.*, 2019). Baixa disponibilidade de nitrogênio, principalmente quando fornecido na forma de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, leva a uma regulação negativa do metabolismo do nitrogênio e das vias relacionadas a respiração vegetal culminando no acúmulo de carboidratos (SCHLÜTER *et al.*, 2012; LI *et al.*, 2023). Logo, o maior teor de carboidratos como AR, AST e amido em plantas jovens de *Z. tuberculosa* sob menor teor de nitrogênio decorreu da regulação negativa sobre genes e enzimas envolvidos no metabolismo de carboidratos e menor incorporação de nitrogênio em carboidratos, que é reforçado pela diminuição no teor de aminoácidos.

A deficiência de nitrogênio tem um impacto marcante na homeostase redox, o que leva a uma alta produção e acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ASAD *et al.*, 2023). Menores concentrações de nitrogênio levou a maior atividade da SOD em folhas e raízes de *Z. tuberculosa* e, concomitantemente a maiores teores de  $H_2O_2$ . Em resposta ao aumento nos teores de  $H_2O_2$ , houve uma maior atividade da APX nessa espécie. A elevada atividade da APX em folhas e raízes de *Z. tuberculosa* sob baixa disponibilidade de nitrogênio pode ser devido a maior afinidade dessa enzima ao  $H_2O_2$  e, consequentemente, sua maior eficiência em degradar essa molécula, evitando seus possíveis danos às células (SOFO *et al.*, 2015; ANJUM *et al.*, 2016; LI, 2023).

Conforme a concentração de nitrogênio foi aumentando na solução nutritiva, a atividade da APX diminuiu e a atividade da CAT aumentou indicando que, sob baixa produção de  $H_2O_2$ , a função dessa segunda enzima está mais relacionada a manutenção da homeostase redox da espécie em estudo através da via peroxidática. Além da atividade da CAT estar limitada principalmente aos peroxissomos e mitocôndrias, a via de atividade dessa enzima também é dependente das concentrações de  $H_2O_2$ , podendo atuar numa via peroxidática sob baixas concentrações de  $H_2O_2$ , ou de forma catalítica quando a planta produz elevadas concentrações de  $H_2O_2$  (ANJUM *et al.*, 2016).

Nos resultados do segundo experimento percebeu-se que, na ausência de alumínio ou sob  $NO_3^-$  e  $NH_4^+$  como fonte única de nitrogênio não houve diferença entre no acúmulo de massa seca em *Z. tuberculosa*. Por outro lado, sob fontes mistas de  $NO_3^-$  e  $NH_4^+$  (75/25, 50/50 e 25/75) a massa seca acumulada em folhas se manteve igual, enquanto nas raízes houve uma maior produção de biomassa nas plantas fertilizadas com 75/25, levando a uma maior razão raiz/parte aérea nesse tratamento (FIGURA 12). O maior acúmulo de massa seca nas plantas nutridas com fontes mistas de nitrogênio pode estar associado a maior síntese de pigmentos fotossintéticos e, possivelmente, a maior incorporação de carbono pela planta (QIANG *et al.*, 2023).

A toxicidade por alumínio pode diminuir a eficiência do uso do nitrogênio em até 60%, consequentemente, afetando o acúmulo de massa seca em plantas (BORGES *et al.*, 2020). Sob fontes únicas de  $NO_3^-$  ou  $NH_4^+$ , a dose de 600  $\mu M$   $Al^{3+}$  diminuiu a massa seca em folhas e raízes de *Z. tuberculosa*. Por outro lado, sob fontes combinadas de diferentes proporções de  $NO_3^-$  e  $NH_4^+$ , o acúmulo de biomassa nessa espécie variou sob as diferentes concentrações de alumínio, havendo aumento da massa seca nas plantas nutridas com 75/25 e submetidas a 1200  $\mu M$   $Al^{3+}$  (FIGURA 12). Isso indica que, as diferentes fontes de nitrogênio podem interagir com esse metal, modulando seus efeitos sobre o crescimento da planta.

Com relação ao crescimento de *Z. tuberculosa* submetida a fontes isoladas de nitrogênio, o único parâmetro de crescimento que diferiu entre  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4^+$  foi razão raiz/parte aérea e altura da planta, havendo diminuição desses parâmetros sob a fertilização com  $\text{NH}_4^+$ . No geral, a proporção de 50/50 resultou em maiores valores de crescimento principalmente com relação à altura da planta, área foliar e diâmetro do caule (FIGURA 12). Em estudo de meta-análise foi observado que, plantas nutridas com  $\text{NO}_3^-$  tendem a investir mais no crescimento da parte aérea, enquanto plantas nutridas com  $\text{NH}_4^+$  investem mais energia para o crescimento radicular (YAN; XU; XIA, 2019).

O maior crescimento da parte aérea sob nitrogênio fornecido na forma de  $\text{NO}_3^-$  pode estar relacionado a maior demanda dessa parte da planta para a redução do  $\text{NO}_3^-$ , uma vez que sua redução em órgãos fotossintetizantes possui um menor custo energético. Enquanto, plantas nutridas com  $\text{NH}_4^+$ , metabolizam o nitrogênio nas raízes, demandando mais energia nesse órgão (YAN; XU; XIA, 2019). Ademais, nesse estudo foi possível perceber uma maior atividade da NR nas folhas de *Z. tuberculosa* sob nutrição com  $\text{NO}_3^-$ , e maior atividade das enzimas envolvidas na assimilação do  $\text{NH}_4^+$  nas raízes quando as plantas estavam submetidas a nitrogênio amoniacal. Indicando que a assimilação do nitrogênio de forma diferencial nos órgãos da planta em decorrência da fonte de nitrogênio recebida. O fornecimento de  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  juntos à planta permite uma utilização mais equilibrada dos fotoassimilados, sendo esses melhor distribuídos entre assimilação de nitrogênio e crescimento vegetal (BOSCHIERO *et al.*, 2019).

O alumínio é reportado como um elemento benéfico e até essencial para algumas plantas, promovendo seu crescimento por meio do estímulo na absorção de nutrientes pela planta, a exemplo do nitrogênio (RUFTY *et al.*, 1995; OSAKI *et al.*, 1997; WATANABE e OSAKI, 2002; TABALDI *et al.*, 2009; BOJÓRQUEZ-QUINTAL *et al.*, 2017). Todavia, o alumínio também pode interferir negativamente no crescimento vegetal ao gerar perturbações na estrutura celular de folhas e raízes, ou ao se ligar a grupos funcionais de tecidos biológicos, afetando assim a absorção de nutrientes, bem como a fotossíntese nas plantas (LIN *et al.*, 2020; LIN *et al.*, 2023). A presença do alumínio afetou, de forma diversa, os parâmetros de crescimento em plantas jovens de *Z. tuberculosa* supridas com as diferentes fontes de nitrogênio. Mostrando que diferentes proporções de  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  podem desencadear respostas distintas nessa espécie quando exposta ao alumínio (FIGURA 12).

A menor área foliar em mudas de *Z. tuberculosa* submetidas as condições de baixa disponibilidade de nitrogênio, fontes únicas de  $\text{NO}_3^-$  ou  $\text{NH}_4^+$  e exposição a alumínio pode ser resultado de uma menor alocação de nitrogênio para o aparato fotossintético que,

consequentemente, diminui o crescimento das plantas (FIGURA 2f) (HIKOSAKA, 2004; CECHIN; FUMIS, 2004). O efeito deletério do alumínio sobre a área foliar de *Z. tuberculosa* pode estar relacionado a uma menor fixação de carbono decorrente da redução na condutância estomática e menor crescimento foliar (BANHOS *et al.*, 2016).

Na ausência de alumínio, o teor de nitrogênio total nas folhas e raízes de plantas jovens de *Z. tuberculosa* foi maior quando essas foram cultivadas sob maiores teores de  $\text{NH}_4^+$  (FIGURA 13e,f). Isso se explica pela maior absorção de  $\text{NH}_4^+$  por se tratar de um processo passivo, com menor demanda energética e uma taxa de influxo líquido maior quando comparado com o  $\text{NO}_3^-$  (XIAO *et al.*, 2022). Contrariando achados de outras pesquisas com relação à absorção de nitrogênio por plantas expostas ao alumínio (PAL'OVE-BALANG e MISTRÍK, 2007; PAL'OVE-BALANG e ZELINOVA, 2013), a presença desse metal elevou os teores de nitrogênio total nas raízes de *Z. tuberculosa* com altas concentrações de nitrogênio amoniacal. O aumento de nitrogênio nas plantas sob presença de alumínio e nutridas com  $\text{NH}_4^+$  pode ser decorrente da maior atividade de aminação da GDH junto a ação da GS e consequente aumento nos teores de aminoácidos (TANG *et al.*, 2021).

Quanto aos teores de aminoácidos e proteínas, o aumento desses compostos nitrogenados decorrente de maiores concentrações de  $\text{NH}_4^+$  na solução nutritiva foi melhor percebida nas raízes *Z. tuberculosa* (FIGURA 14b,d). Já na presença do alumínio, os teores de aminoácidos e proteínas variaram a depender da concentração de alumínio presente na solução nutritiva. Em plantas submetidas a altos níveis de  $\text{NH}_4^+$ , uma das suas estratégias para evitar a toxicidade causada por esse cátion é a elevação na atividade de GS e GDH, afim de incorporá-lo rapidamente a aminoácidos e evitar seus efeitos deletérios, aumentando assim os compostos nitrogenados dentro da planta (CRUZ *et al.*, 2006; BITTSÁNSZKY *et al.*, 2015). Alguns estudos também apontam o aumento de aminoácidos livres em plantas sob estresse, mitigando o estresse oxidativo (KHAN *et al.*, 2020; YANG *et al.*, 2023). Todavia, no presente estudo, os tratamentos que apresentaram maior peroxidação lipídica também apresentaram alto teor de aminoácidos.

O alumínio alterou diferentemente a absorção de  $\text{NO}_3^-$  em *Z. tuberculosa* nas diferentes proporções de  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  (FIGURA 13a,b). Como reportado na literatura, o alumínio pode atuar de forma sinérgica ou inibitória na absorção de  $\text{NO}_3^-$  (DURIEUX *et al.*, 1993; RUFTY *et al.*, 1995; BURNHAM *et al.*, 2017). Em altas concentrações o alumínio pode interagir diretamente com transportadores de  $\text{NO}_3^-$  inibindo a absorção desse ânion (ZHAO; SHEN, 2018). Os resultados aqui obtidos indicam que o uso de diferentes fontes de nitrogênio pode



mitigar os efeitos deletérios do alumínio sobre a absorção de nitrogênio na forma de  $\text{NO}_3^-$  pelas raízes de *Z. tuberculosa*.

Quanto ao  $\text{NH}_4^+$ , esse precisa ser rapidamente incorporado a moléculas orgânicas para evitar seus efeitos tóxicos à planta (CRUZ *et al.*, 2006). Logo, o expressivo aumento dessa molécula em folhas de *Z. tuberculosa* fertilizadas com 0/100  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  (FIGURA 13c) pode ser devido ao aumento da fotorrespiração, como também observado por Lemos *et al.* (1999) em trabalho com seringueira, ou mesmo como resultado do catabolismo de compostos nitrogenados como resposta ao efeito tóxico dessa fonte de nitrogênio. Essa toxidez é evidenciada pela elevada peroxidação lipídica e menor crescimento desses indivíduos.

A presença do alumínio agravou o acúmulo de  $\text{NH}_4^+$  nas folhas das plantas sob essa forma de nitrogênio, porém esse aumento pode ser resultado da maior translocação de alumínio para as folhas de *Z. tuberculosa*. A elevação no teor de  $\text{NH}_4^+$  nas folhas dessa espécie sob efeito do alumínio pode ser devido a um aumento na fotorrespiração, uma vez que, esse metal pode reduzir a condutância estomática e isso pode gerar uma menor concentração de  $\text{CO}_2$  no interior das células vegetais levando a uma maior atividade oxigenase da Rubisco (BANHOS *et al.*, 2016; EISENHUT *et al.*, 2017; GAVASSI *et al.*, 2021).

O baixo teor de  $\text{NH}_4^+$  nas raízes de *Z. tuberculosa* nas proporções de 100/0, 75/25 e 50/50 demonstra que a atividade da GS foi eficiente em assimilar em aminoácido os baixos teores absorvidos de  $\text{NH}_4^+$ , evitando seu acúmulo nos tecidos radicular (FIGURA 13d). Essa hipótese é reforçada pela maior demanda de GS nos tratamentos com maior concentração de  $\text{NH}_4^+$  na solução nutritiva (FIGURA 15d). A elevada síntese e atividade da GS em raízes é apontada como uma das principais características para a tolerância ao excesso de  $\text{NH}_4^+$  em plantas (ZHOU *et al.*, 2021). A diminuição nos teores de  $\text{NH}_4^+$  nas plantas nutridas apenas com essa molécula como fonte de nitrogênio e exposta ao alumínio, não parece ser devido ao efeito inibitório desse metal sobre absorção do  $\text{NH}_4^+$  (ZHAO; SHEN; SUN, 2009; CHEN *et al.*, 2010). Mas resultado de sua maior assimilação pela atividade concomitante da GS e GDH observados nesses tratamentos.

As diferentes proporções de  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4^+$  utilizada nesse trabalho, resultou em diferentes padrões de atividade da NR (FIGURA a,b). A maior atividade da NR na ausência do alumínio ocorreu sob as proporções de 100/0 e 50/50 tanto em folhas, como em raízes de *Z. tuberculosa*. O  $\text{NH}_4^+$  pode atuar como um regulador negativo dos níveis de NR em plantas (KIM *et al.*, 2018). Porém, a inibição da atividade da NR pelo  $\text{NH}_4^+$  só parece acontecer na proporção 75/25, enquanto nas proporções de 25/75 e 0/100 a menor atividade dessa enzima provavelmente está

relacionada a baixa disponibilidade de seu substrato (ROUBY *et al.*, 2002; KONISHI e YANAGISAWA, 2011).

O efeito inibitório do alumínio na atividade da NR nas folhas de *Z. tuberculosa* sob 75/25, 50/50 e 0/100 foi condizente com o resultado de outros trabalhos (CUPERTINO *et al.*, 2016; SANTOS *et al.* 2016). Esses dados indicam que o efeito deletério do alumínio sobre essa enzima não se baseia apenas na diminuição da absorção de  $\text{NO}_3^-$  pela planta como o observado por Ferrario *et al.* (1995), mas esse elemento parece interagir diretamente com essa enzima (CAMBRAIA *et al.* 1989). Uma vez que nessas mesmas proporções não houve diferença significativa nos teores de  $\text{NO}_3^-$  entre as diferentes concentrações de alumínio sob 50/50 e 0/100 e houve aumento no teor de  $\text{NO}_3^-$  no tratamento com 600  $\mu\text{M}$  de Al alumínio na proporção de 75/25. Por outro lado, o aumento na atividade da NR nas folhas dessa espécie quando nutridas com 25/75 sob a concentração de 1200  $\mu\text{M}$  Al, pode indicar que alguns produtos do processo assimilatório do nitrogênio possa modificar a resposta dessa espécie à exposição ao alumínio. Estudos já demonstraram um efeito positivo do  $\text{NH}_4^+$  sobre a atividade da NR, indicando que a proporção de  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  pode estar mais envolvida no efeito do  $\text{NH}_4^+$  sobre a atividade dessa enzima (ASLAM *et al.*, 1997; BUNGARD *et al.*, 1999; KIM *et al.*, 2016).

O efeito positivo do alumínio sobre a atividade da GS já foi reportado na literatura e está relacionada a atuação do  $\text{Al}^{3+}$  complexado se ligando à essa proteína e aumentando sua atividade de forma semelhante ao magnésio (KERTÉSZ *et al.*, 2002). A maior atividade da GS em *Z. tuberculosa* parece ser um importante fator para a tolerância em plantas estressadas por alumínio, reassimilando rapidamente o  $\text{NH}_4^+$  gerado pelo estresse (FIGURA 15c,d) (SILVEIRA *et al.*, 2003; TEIXEIRA e FIDALGO, 2009). Ademais, as diferentes isoformas da GS passam por diversas alterações em suas atividades a depender do órgão e das fontes de nitrogênio utilizadas (BHAKTI e ESPEN, 2015).

Sob alta disponibilidade de  $\text{NH}_4^+$ , a GDH pode atuar em algumas plantas na via de aminação, juntamente com GS, incorporando  $\text{NH}_4^+$  em  $\alpha$ -cetoglutarato formando glutamato (VEGA-MAS *et al.*, 2019; TANG *et al.*, 2021). Quanto ao aumento da GOGAT, esse parece ser resultado da maior demanda pela ação dessa enzima afim de metabolizar a glutamina produzida pela alta disponibilidade de  $\text{NH}_4^+$  e elevada atividade da GS. O aumento na atividade da GOGAT e GDH tanto em folhas quanto nas raízes de *Z. tuberculosa* quando expostas a diferentes proporções de  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  e ao alumínio (FIGURA 16), pode ser devido à alta demanda dessa planta por glutamato, uma vez que esse aminoácido e seus derivados são mais dinâmicos em resposta a condições adversas para a planta (YANG *et al.*, 2020).

Com relação a síntese das clorofilas, o fornecimento de  $\text{NH}_4^+$  levou a um maior acúmulo de clorofila a e b, quando comparado ao fornecimento isolado de  $\text{NO}_3^-$  às plantas de *Z. tuberculosa* (FIGURA 17b,c). Esses resultados contrariam o que é postulado na literatura que traz o  $\text{NO}_3^-$  como um regulador positivo da síntese desses pigmentos fotossintéticos, afetando diretamente a síntese dos seus precursores (WEN *et al.*, 2020). E indica que não o  $\text{NO}_3^-$ , mas os produtos de sua assimilação que podem estar envolvidos com a sinalização da biossíntese desses pigmentos em *Z. tuberculosa*. Vale ressaltar que o glutamato é um importante aminoácido precursor das clorofilas (CHIKARAISHI *et al.* 2005). Sendo assim, a elevada concentração de aminoácidos, bem como a alta atividade da GOGAT e GDH, nos tratamentos com elevada concentração de  $\text{NH}_4^+$  são indícios que esses metabolitos estejam relacionados ao aumento no teor de clorofila.

Para algumas espécies, os efeitos deletérios do alumínio sobre o metabolismo do carbono estão associados à diminuição da condutância estomática devido a alterações que esse metal gera nos vasos condutores nas raízes das plantas (BANHOS *et al.*, 2016). Enquanto, em outras espécies o acúmulo de carboidratos é relacionado a seu mecanismo de resistência (CÁRCAMO-FINCHEIRA *et al.*, 2023). Em *Z. tuberculosa*, a produção de pigmentos fotossintéticos foi afetada positivamente na presença do alumínio para a maioria das proporções de  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  utilizadas, com exceção dos carotenoides sob 0/100 e da clorofila b sob 50/50 (FIGURA 17).

Quanto aos menores teores de carboidratos em folhas e raízes de plantas jovens de *Z. tuberculosa* fertilizadas com maiores proporções de  $\text{NO}_3^-$  reforça a ação deletéria dessa fonte de nitrogênio sobre as enzimas do metabolismo do carbono (FIGURA 18) (SCHLÜTER *et al.*, 2012). A fertilização nitrogenada tendo a ureia como fonte de nitrogênio levou a alterações na síntese, metabolismo e nas propriedades físico-químicas do amido em milho não cerosos, regulando positivamente genes que atuam na síntese de amido (WANG *et al.*, 2024). Isso indica que as diferentes proporções de  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  podem modular as vias de síntese de amido em *Z. tuberculosa*.

Maiores concentrações de  $\text{NH}_4^+$  na solução nutritiva levaram a maiores teores de prolina nas raízes de *Z. tuberculosa* independente da exposição ao alumínio (Figura 19 a,b). Porém, sob a presença desse metal, os teores de prolina foram ainda maiores. Já nas folhas dessa espécie, mudanças efetivas no acúmulo de prolina só ocorreu nas proporções de 100/0 e 25/75  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ , onde na primeira houve diminuição dessa molécula. Nas plantas submetidas a condições de estresse abiótico, a prolina pode atuar como forte antioxidante fortalecendo o

sistema antioxidante não enzimático (SILVA e MATOS, 2016; MALIK *et al.*, 2021). A prolina, assim como outros osmólitos, podem mitigar, direta ou indiretamente, os efeitos adversos do estresse oxidativo eliminando espécies reativas de oxigênio elevando o teor de compostos bioativos antioxidantes ou induzindo atividades enzimáticas antioxidantes (EJAZ *et al.*, 2020). Os resultados encontrados nesse trabalho demonstram que o aumento no teor de prolina não foi suficiente para mitigar a peroxidação lipídica em *Z. tuberculosa*.

O fornecimento de  $\text{NH}_4^+$  à *Z. tuberculosa* levou a maiores danos oxidativos observados pelo aumento na peroxidação lipídica a partir da proporção 50/50, principalmente nas raízes dessa espécie, apesar da elevada atividade das enzimas do sistema antioxidante aqui estudadas (FIGURA 19e,f). Esses resultados indicam que a nutrição com  $\text{NH}_4^+$  levou a demasiada produção de EROs em *Z. tuberculosa*, não sendo suficiente o aumento na atividade das enzimas do sistema antioxidante para manter a homeostase redox, indicando que essa espécie não se configura como tendo preferência por essa fonte de nitrogênio (PODGORSKA; SZAL, 2014).

O fornecimento do  $\text{NH}_4^+$  como fonte única de nitrogênio pode elevar a produção de ânions superóxido e  $\text{H}_2\text{O}_2$  e, conseqüentemente, o acúmulo de MDA nas plantas através da diminuição na eficiência fotossintética devido ao baixo desempenho da cadeia transportadora de elétrons no cloroplasto, resultando em excesso de energia luminosa (CHEN *et al.*, 2023). A menor peroxidação lipídica nas raízes das plantas sob elevado nível de  $\text{NO}_3^-$  na ausência de alumínio na solução nutritiva pode estar relacionada a função protetora que essa molécula confere às plantas (FIGURA 19f) (WEN *et al.*, 2020). Uma via possível da ação do  $\text{NO}_3^-$  na defesa antioxidante das plantas pode ser por meio da produção de óxido nítrico induzida pela atividade da NR, uma molécula apontada como reguladora positiva do sistema antioxidante das plantas, inclusive quando essas são expostas ao alumínio (SUN *et al.*, 2014; WANG *et al.*, 2017; ZHANG *et al.*, 2019a).

A presença do alumínio na solução nutritiva com alto nível de  $\text{NH}_4^+$  elevou o teor de  $\text{H}_2\text{O}_2$  tanto na raiz quanto na parte aérea (FIGURA 19c,d). Enquanto nas folhas, sob fornecimento de  $\text{NO}_3^-$  como fonte única de nitrogênio a concentração de 600  $\mu\text{M}$   $\text{Al}^{3+}$  reduziu a produção de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . As maiores produções de  $\text{H}_2\text{O}_2$  foi observada nas raízes de *Z. tuberculosa*, tanto sob contaminação com alumínio quanto pelo aumento na proporção de  $\text{NH}_4^+$  sobre  $\text{NO}_3^-$ . Esse resultado demonstra que o sistema antioxidante na espécie em estudo é primeiramente ativado na raiz, uma vez que esses órgãos são os primeiros a entrar em contato com os fatores estressores presente no solo. Já é conhecido que a raiz é o órgão vegetal mais afetado pelo alumínio e uma das formas deletérias desse metal sobre a raiz é por meio da elevação de EROs

na zona de transição do ápice radicular, afetando o alongamento desse órgão (JIANG *et al.*, 2023).

É reportado na literatura que o fornecimento de  $\text{NH}_4^+$  às plantas pode ajudar na homeostase redox através da ativação da defesa sistêmica da planta, aumentando a atividade das enzimas do sistema antioxidante (ZENG *et al.*, 2021; DUAN *et al.*, 2023). De fato, maiores níveis de  $\text{NH}_4^+$  na solução nutritiva levaram ao aumento na atividade da SOD nas raízes e da APX nas folhas de *Z. tuberculosa* (FIGURA 20b, e). Por outro lado, sob maiores concentrações de  $\text{NH}_4^+$ , a atividade da SOD e CAT diminuíram nas folhas dessa espécie (FIGURA 20a, c). De forma geral, o alumínio atuou como antagonico ou benéfico sobre a atividade das enzimas antioxidantes nas diferentes proporções  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ . Outras enzimas são apontadas com responsáveis pela defesa antioxidante em plantas expostas ao alumínio, como é o caso da glutathione S-transferase, a qual sua expressão foi superior a da SOD e a peroxidase não dependente da glutathione em plantas de linho (DMITRIEV *et al.*, 2016). Diante desses resultados é importante considerar que além das EROs, as plantas também produzem espécies reativas de nitrogênio, carbonila e enxofre quando estão expostas a estressores (ZHOU *et al.*, 2022), podendo esse também ser o caso de *Z. tuberculosa* sob exposição ao alumínio e alto teor de  $\text{NH}_4^+$ .

O aumento nas concentrações de  $\text{NH}_4^+$  na solução nutritiva elevou os teores de fósforo nas raízes de *Z. tuberculosa* quando não exposta ao alumínio e, nessas condições essa espécie também acumulou maiores concentrações de nitrogênio (FIGURA 21d). O  $\text{NH}_4^+$  pode aumentar a absorção do fósforo aumentando o comprimento, número e área de superfície da raiz da planta. Esse cátion também é capaz de manter a homeostase interna do fósforo por meio da regulação de genes envolvidos na captação, transporte e equilíbrio interno desse nutriente (ZHU *et al.*, 2022). Uma maior suplementação de nitrogênio ativa a absorção de fósforo quando esse se encontra em baixas concentrações, indicando que as plantas priorizam a aquisição de nitrogênio em detrimento de fósforo (KUMAR; KUMAR; MOHAPATRA, 2021). Isso indica que a maior absorção de fósforo pelas plantas fertilizadas com alto teor  $\text{NH}_4^+$  esteja relacionado a alta absorção de nitrogênio das mesmas.

Já é bem conhecido os efeitos deletérios do alumínio sobre a absorção de fósforo pelas plantas e seus danos sobre o metabolismo vegetal (CHEN; LIAO, 2016; QU *et al.*, 2020; KARIMAEI; POOZESH; REZAEI, 2022; FENG *et al.*, 2023), efeito também observado nesse estudo. Plantas jovens de *Z. tuberculosa* expostas ao alumínio acumularam menores teores de fósforo em suas folhas e raízes sob todas as fontes de nitrogênio utilizadas (FIGURA 21c, d). O alumínio pode reduzir a disponibilidade do fósforo por precipitação ou adsorção ainda na

rizosfera (SOUZA, 1991; WANG *et al.*, 2019; WAN *et al.*, 2020). Porém, os estudos relacionado alumínio e fósforo indicam que a eficiência do uso de fósforo pelas plantas está mais intimamente relacionada ao efeito desse nutriente na toxicidade do alumínio (CHEN *et al.* 2012).

Quanto ao alumínio, não houve diferença nos teores desse elemento nas raízes das plantas que receberam  $\text{NO}_3^-$  ou  $\text{NH}_4^+$  como fonte única de nitrogênio entre as plantas expostas ou não ao alumínio. Enquanto, nas folhas o teor de alumínio aumentou nas plantas sob fontes isoladas de nitrogênio (FIGURA 21a, b). Esses resultados indicam que, plantas fertilizadas com fontes únicas de nitrogênio como  $\text{NO}_3^-$  ou  $\text{NH}_4^+$ , tem seus mecanismos de tolerância modificados, diminuindo a absorção do alumínio, mas transportando maiores teores desse metal para a parte aérea (BRUNNER; SPERISEN, 2013).

O  $\text{NO}_3^-$  pode atuar diminuindo a absorção do alumínio pelas plantas através da maior liberação de ácidos orgânicos pelas raízes ou alcalinização da rizosfera (FANG *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2023). Enquanto o  $\text{NH}_4^+$  aumenta a resistência ao alumínio por meio de competição, diminuindo a adsorção desse metal à parede celular (ZHAO; SHEN; SUN, 2009; CHEN *et al.*, 2010). O fornecimento isolado de  $\text{NO}_3^-$  ou  $\text{NH}_4^+$  à mudas de *Z. tuberculosa* pode ter otimizados essas estratégias na planta, enquanto ao fornecer essas duas fontes em conjunto os sinais que desencadeiam essas estratégias não foram ativados.

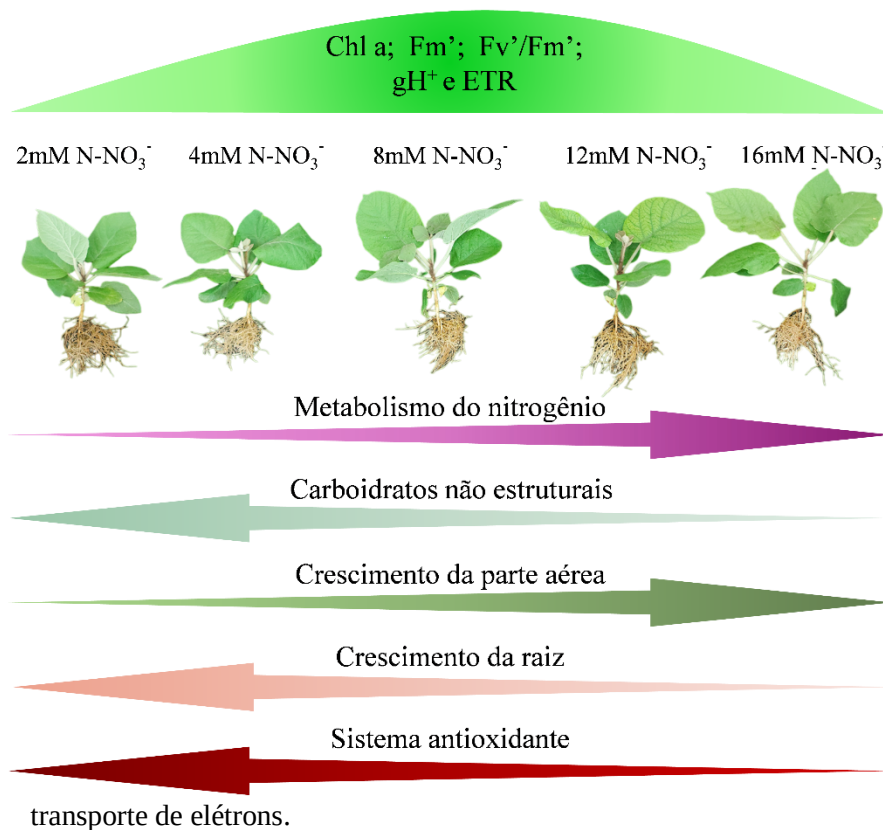
Os maiores teores de alumínio foram observados nas raízes de plantas que receberam fontes mistas de nitrogênio, porém houve menor translocação desse metal para folhas, uma vez que não houve diferença estatística entre os valores de alumínio acumulado nas folhas das plantas nessa condição nutricional e expostas a esse metal quando comparado às não expostas (FIGURA 21a, b). A menor absorção de alumínio pelas plantas nutridas com fontes únicas de nitrogênio pode ter resultado em menores danos a condutância estomática. Uma vez que a via de transporte desse metal para partes superiores das plantas é via xilema, uma maior condutância estomática pode ter levado a maior translocação de alumínio (BANHOS *et al.*, 2016).

## 6. CONCLUSÃO

Em *Z. tuberculosa*, a baixa disponibilidade de nitrogênio levou a uma maior atividade de enzimas antioxidantes, acúmulo de carboidratos não estruturais e elevado *quenching* não fotoquímico. As alterações desses parâmetros levaram a menor produção de biomassa nas plantas e menor razão raiz/parte aérea. Por outro lado, as concentrações utilizadas nesse estudo a partir de 8 mM N- $\text{NO}_3^-$ , o metabolismo do nitrogênio e carbono tiveram uma maior atividade

e em consequência as plantas apresentaram uma melhor distribuição do crescimento entre parte aérea e raiz (FIGURA 21). Portanto, os resultados desse estudo demonstram que 10 mM  $\text{N-NO}_3^-$  seria uma concentração ideal para o crescimento de plantas jovens de *Z. tuberculosa*.

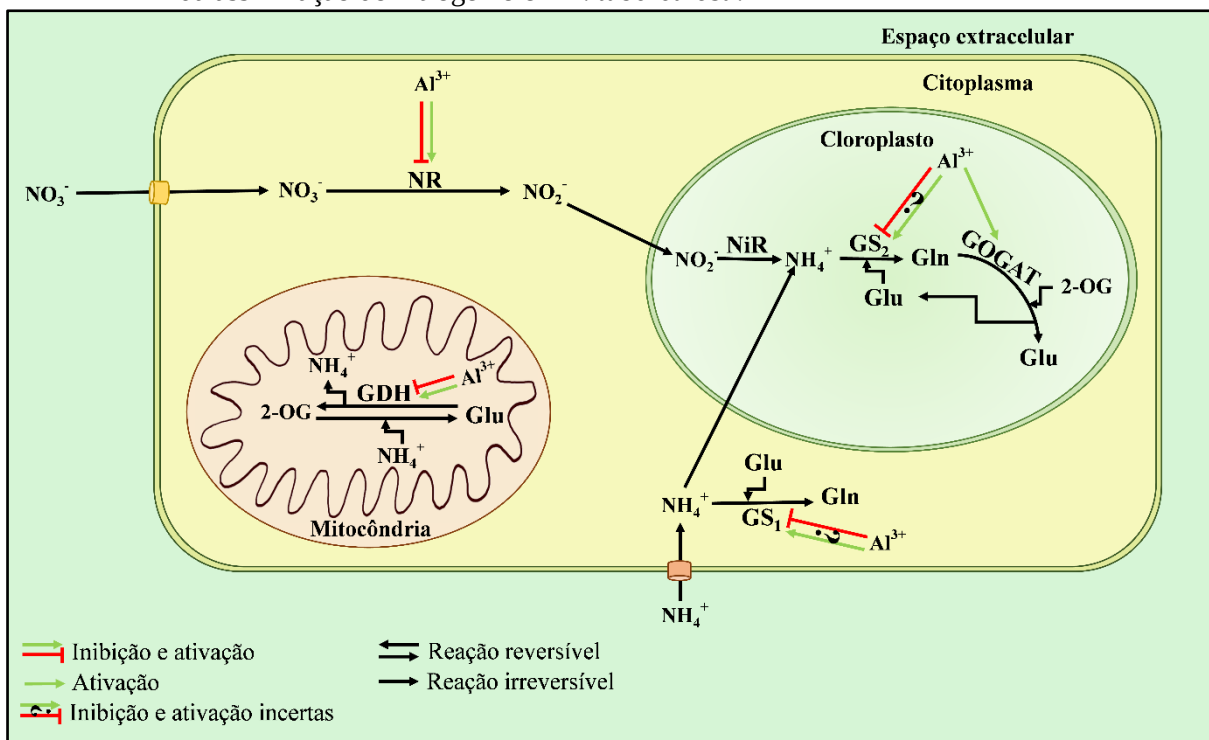
FIGURA 21 – Esquema gráfico representando uma visão geral dos resultados do experimento 1. A direção apontada pelas setas representa o sentido em que houve aumento nos valores observados por cada variável apresentado no esquema. Chl a – clorofila a;  $\text{Fm}'$  – Fluorescência máxima da clorofila a;  $\text{Fv}'/\text{Fm}'$  – eficiência quântica do fotossistema II;  $\text{gH}^+$  - taxa de fluxo de prótons que passam através da ATP sintase e ETR - taxa de



Da autora (2023)

O fornecimento de  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4^+$  na proporção 50/50, de forma geral, manteve estável o metabolismo de nitrogênio, carbono e antioxidante das plantas jovens de *Z. tuberculosa*, refletindo na manutenção dos seus parâmetros de crescimento mesmo sob a presença de alumínio. Apesar do aumento no acúmulo de nitrogênio nas raízes de plantas expostas ao alumínio e nutridas com a proporção de 50/50  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ , esse metal parece não ser essencial ao desenvolvimento de *Z. tuberculosa*. Uma vez que, a adição de alumínio na solução nutritiva, de modo geral, não levou a aumento nos parâmetros biométricos nas plantas (FIGURA 22).

FIGURA 22 – Esquema gráfico com uma visão dos efeitos do alumínio sobre a atividade das enzimas da assimilação do nitrogênio em *Z. tuberculosa*.



Da autora (2023)

## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nesse trabalho foi observado o padrão de ação das enzimas envolvidas no metabolismo do nitrogênio em *Z. tuberculosa*, bem como a interação dessas enzimas com o alumínio disponível na rizosfera. Assim, pudemos perceber que a presença do alumínio na rizosfera afeta a atividade das enzimas envolvidas no metabolismo do nitrogênio. Essas informações são de extrema relevância para a elucidação do metabolismo do nitrogênio em plantas nativas de ambientes diversos, levantando novas questões que podem guiar outros estudos nessa área.

Mais estudos são necessários para elucidar os mecanismos pelos quais o alumínio interage com os metabolismos do nitrogênio, carbono e antioxidante em *Z. tuberculosa*. Nesse trabalho, sob todas as proporções de  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  houve acúmulo de alumínio nas raízes de *Z. tuberculosa* superior a  $1000 \text{ mg} \cdot \text{Kg}^{-1}$ , o que poderia levar a classificação dessa espécie como acumuladora de alumínio utilizando a estratégia de tolerância interna a esse metal. Porém, para chegar a essa conclusão seria necessário fazer histolocalização do alumínio no tecido vegetal para validar essa hipótese. Avaliar a exsudação de ácidos orgânicos pelas raízes dessa planta também poderia ser uma ferramenta importante para elucidar os mecanismos utilizados pela espécie para diminuir os danos causados por esse metal.

Conhecer melhor as plantas nativas com capacidade para absorver e acumular o alumínio do solo é fundamental para diminuir os níveis desse elemento no solo e possibilitar,



posteriormente, o desenvolvimento de espécies sensíveis a esse metal. Com esse estudo foram obtidos resultados relevantes sobre os efeitos da interação entre nutrição nitrogenada e presença de alumínio no solo sobre o crescimento de *Z. tuberculosa*, podendo ser mais exploradas em outras espécies potencialmente relevantes nesse contexto. Essas informações possibilitam traçar melhores estratégias para a conservação da flora, melhorando a elaboração de projetos de reflorestamento de áreas degradadas. Bem como fornece conhecimento básico para a melhor utilização dos recursos em relação a adubação e as tomadas de decisões para contornar as limitações impostas pelo ambiente, como é o caso da elevada concentração de alumínio em regiões de solos ácidos.

## REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, T. P. *et al.* Sobrevivência e estoque de carbono de espécies florestais em plantio de neutralização na região de Mata Atlântica. In: OLIVEIRA, R. J. **Recursos hídricos: gestão, planejamento e técnicas em pesquisa**. 2022. Volume 2, 1ª ed. Viçosa: Editora Científica Digital. p.190 – 204, 2022.
- ALT, D. S.; DOYLE, J. W.; MALLADI, A. Nitrogen-source preference in blueberry (*Vaccinium* sp.): Enhanced shoot nitrogen assimilation in response to direct supply of nitrate. **Journal of plant physiology**, [s. l.], v. 216, p. 79-87, 2017.
- ANDREWS, M. The partitioning of nitrate assimilation between root and shoot of higher plants. **Plant, Cell & Environment**, [s. l.], v.9, n.7, 511-519, 1986.
- ANJUM, N. A. *et al.* Catalase and ascorbate peroxidase – representative H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-detoxifying heme enzymes in plants. **Environmental science and pollution research**, [s. l.], v.23, p.19002-19029, 2016.
- ARASIMOWICZ-JELONEK, M. *et al.* Aluminum induces cross-resistance of potato to *Phytophthora infestans*. **Planta**, [s. l.], v. 239, n. 3, p. 679-694, 2014.
- ARNOLD, A.; SAJITZ-HERMSTEIN, M.; NIKOLOSKE, Z. Effects of varying nitrogen sources on amino acid synthesis costs in *Arabidopsis thaliana* under different light and carbon-source conditions. **PLoS One**, [s. l.], v. 10, n. 2, p. e0116536, 2015.
- ASAD, M. A. U., *et al.* Involvement of plant signaling network and cell metabolic homeostasis in nitrogen deficiency-induced early leaf senescence. **Plant Science**, [s. l.], v.336, p.111855, 2023.
- ASHRAF, M. *et al.* Salinity effects on nitrogen metabolism in plants—focusing on the activities of nitrogen metabolizing enzymes: A review. **Journal of Plant Nutrition**, [s. l.], v. 41, n. 8, p. 1065-1081, 2018.
- ASLAM, M. *et al.* Differential effect of ammonium on the induction of nitrate and nitrite reductase activities in roots of barley (*Hordeum vulgare*) seedlings. **Physiologia Plantarum**, [s. l.], v.101, n.3, p.612-619, 1997.
- BALESTRASSE, K. B.; GALLEGOS, S. M.; TOMARO, M. L. (2006). Aluminium stress affects nitrogen fixation and assimilation in soybean (*Glycine max* L.). **Plant growth regulation**, [s. l.], v.48, p.271-281.
- BANHOS, O. F. *et al.* Aluminum-induced decrease in CO<sub>2</sub> assimilation in ‘Rangpur’ lime is associated with low stomatal conductance rather than low photochemical performances. **Scientia Horticulturae**, [s. l.], v.205, p.133-140, 2016.
- BERGES, J. A.; HARRISON, P. J. Nitrate reductase activity quantitatively predicts the rate of nitrate incorporation under steady state light limitation: a revised assay and characterization of the enzyme in three species of marine phytoplankton. **Limnology and Oceanography**, [s. l.], v. 40, n. 1, p. 82-93, 1995.
- BERTL, A.; KALDENHOFF, R. Function of a separate NH<sub>3</sub>-pore in Aquaporin TIP2;2 from wheat. **FEBS letters**, [s. l.], v. 581, n. 28, p. 5413-5417, 2007.

BIEMELT, S; KEETMAN, U; ALBRECHT, G. Re-aeration following hypoxia or anoxia leads to activation of the antioxidative defense system in roots of wheat seedlings. **Plant Physiology**, [s. l.], v. 116, n. 2, p. 651-658, 1998.

BITTSÁNSZKY A. *et al.* Overcoming ammonium toxicity. **Plant Science**, [s. l.], v.231, p.184-190, 2015.

BLAMEY, F. P. C. The role of the root cell wall in aluminum toxicity. In: **Plant nutrient acquisition**. Springer, Tokyo, 2001. p. 201-226.

BOJÓRQUEZ-QUINTAL, E. *et al.* Aluminum, a friend or foe of higher plants in acid soils. **Frontiers in plant science**, [s. l.], v. 8, p. 1767, 2017.

BOLLE-JONES, E. W. Copper, its effects on the growth of the rubber plant (*Hevea brasiliensis*). **Plant and soil**, [s. l.], v. 10, n. 2, p. 168-178, 1957.

BORGES, C. E. *et al.* Aluminum toxicity reduces the nutritional efficiency of macronutrients and micronutrients in sugarcane seedlings. **Ciência e Agrotecnologia**, [s. l.], v.44, p.e015120, 2020.

BOSCHIERO, B. N., *et al.* Influence of nitrate-ammonium ratio on the growth, nutrition, and metabolism of sugarcane. **Plant Physiology and Biochemistry**, [s. l.], v.139, p.246-255, 2019.

BOUSSADIA, O. *et al.* Effects of nitrogen deficiency on leaf photosynthesis, carbohydrate status and biomass production in two olive cultivars ‘Meski’ and ‘Koroneiki’. **Scientia Horticulturae**, [s. l.], v.123, n.3, p.336-342, 2010.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye-binding. **Analytical Biochemistry**, [s. l.], v. 72, p. 248-254, 1976.

BRESSAN, A. C. G. *et al.* Physiological, anatomical and ultrastructural effects of aluminum on *Styrax camporum*, a native Cerrado woody species. **Journal of Plant Research**, [s. l.], v. 133, n. 5, p. 625-637, 2020.

BRITTO, D. T.; KRONZUCKER, H. J. Ecological significance and complexity of N-source preference in plants. **Annals of botany**, [s. l.], v. 112, n. 6, p. 957-963, 2013.

BRIX, H.; EBELL, L. F. Effects of Nitrogen Fertilization on Growth, Leaf Area, and Photosynthesis Rate in Douglas-Fir. **Forest Science**, [s. l.] v.15, n.2, p. 189–196, 1969.

BRUNNER, I.; SPERISEN, C. Aluminum exclusion and aluminum tolerance in woody plants. **Frontiers in Plant Science**, [s. l.], v. 4, p. 172, 2013.

BUNGARD, R. A. *et al.* Ammonium can stimulate nitrate and nitrite reductase in the absence of nitrate in *Clematis vitalba*. **Plant, Cell & Environment**, [s. l.], v.22, n.7, p.859-866, 1999.

CAMBRAIA, J. *et al.* Aluminum effects on nitrate uptake and reduction in sorghum. **Journal of plant nutrition**, [s. l.], v.12, n.12, p.1435-1445, 1989.

- CÁRCAMO-FINCHEIRA, P. *et al.* Physiological and metabolic responses to aluminum toxicity reveal differing resistance mechanisms to long-term exposure in highbush blueberry cultivars. **Scientia Horticulturae**, [s. l.], v.309, p.111665, 2023.
- CARVALHO, P. A. de *et al.* Effect of nitrogen source and oxygen deficiency on carbon metabolism and antioxidant system of rubber tree plants (*Hevea* spp.). **Australian Journal of Crop Science**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 116-125, 2018.
- CARVALHO, P. E. R. Ipê-Felpudo. **Embrapa Florestas-Circular Técnica (INFOTECA-E)**, 2005.
- CASTRO MARÍN, I. *et al.* Nitrate regulates floral induction in *Arabidopsis*, acting independently of light, gibberellin and autonomous pathways. **Planta**, [s. l.], v.233, p.539-552, 2011.
- CECHIN, I.; FÁTIMA FUMIS, T. Effect of nitrogen supply on growth and photosynthesis of sunflower plants grown in the greenhouse. **Plant Science**, [s. l.], v.166, n.5, p.1379-1385, 2004.
- CHEN, H. *et al.* Ammonium nutrition inhibits plant growth and nitrogen uptake in citrus seedlings. **Scientia Horticulturae**, [s. l.], v.272, p.109526, 2020.
- CHEN, H. *et al.* Declined photosynthetic nitrogen use efficiency under ammonium nutrition is related to photosynthetic electron transport chain disruption in citrus plants. **Scientia Horticulturae**, [s. l.], v.308, p.111594, 2023.
- CHEN, H. *et al.* Global transcriptome analysis reveals distinct aluminum-tolerance pathways in the Al-accumulating species *Hydrangea macrophylla* and marker identification. **PLoS One**, [s. l.], v. 10, n. 12, p. e0144927, 2015.
- CHEN, R. F. *et al.* Investigation of Aluminum-Tolerant Species in Acid Soils of South China. **Communications in soil science and plant analysis**, [s. l.], v. 39, n. 9-10, p. 1493-1506, 2008.
- CHEN, Z. C.; LIAO, H. Organic acid anions: An effective defensive weapon for plants against aluminum toxicity and phosphorus deficiency in acidic soils. **Journal of genetics and genomics**, [s. l.], v.43, n.11, p.631-638, 2016.
- CHEN, Z. C.; ZHAO, X. Q.; SHEN, R. F. The alleviating effect of ammonium on aluminum toxicity in *Lespedeza bicolor* results in decreased aluminum-induced malate secretion from roots compared with nitrate. **Plant and soil**, [s. l.], v. 337, n. 1, p. 389-398, 2010.
- COELHO, C. H. *et al.* Campos Wet deposition of major ions in a rural area impacted by biomass burning emissions. **Atmospheric Environment**, [s. l.], v. 45, n. 30, p. 5260-5265, 2011.
- COSKUN, D. *et al.* How plant root exudates shape the nitrogen cycle. **Trends in Plant Science**, [s. l.], v.22, n.8, p.661-673, 2017.
- CRUZ, C. *et al.* How does glutamine synthetase activity determine plant tolerance to ammonium? **Planta**, [s. l.], v.223, p.1068-1080, 2006.

- DAIMS, H. *et al.* Complete nitrification by *Nitrospira* bacteria. **Nature**, [s. l.], v.528, n.7583, p.504-509, 2015.
- DANIEL-VEDELE, F.; KRAPP, A.; KAISER, W. M. Cellular biology of nitrogen metabolism and signaling. In: **Cell biology of metals and nutrients**. Springer, Berlin, Heidelberg, 2010. p. 145-172.
- DANTAS, A. A. A.; CARVALHO, L. G. de; FERREIRA, E. Classificação e tendências climáticas em Lavras, MG. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 6, p. 1862-1866, 2007.
- DE ALMEIDA, N. M. *et al.* Molecular, biochemical, morphological and ultrastructural responses of cacao seedlings to aluminum ( $\text{Al}^{3+}$ ) toxicity. **Acta physiologiae plantarum**, [s. l.], v. 37, n. 2, p. 5, 2015.
- DIER, M. *et al.* Effects of free air carbon dioxide enrichment (FACE) on nitrogen assimilation and growth of winter wheat under nitrate and ammonium fertilization. **Global change biology**, [s. l.], v. 24, n. 1, p. e40-e54, 2018.
- DMITRIEV, A. A. *et al.* Glutathione S-transferases and UDP-glycosyltransferases are involved in response to aluminum stress in flax. **Frontiers in Plant Science**, [s. l.], v.7, p.1920, 2016.
- DONG, F. *et al.* Effects of nitrogen supply on flavonol glycoside biosynthesis and accumulation in tea leaves (*Camellia sinensis*). **Plant Physiology and Biochemistry**, [s. l.], v.138, p.48-57, 2019.
- DUAN, Y. *et al.* Integrative physiological, metabolomic and transcriptomic analysis reveals nitrogen preference and carbon and nitrogen metabolism in blackberry plants. **Journal of Plant Physiology**, [s. l.], v.280, p.153888, 2023.
- DURIEUX, R. P. *et al.* Inhibition of nitrate uptake by aluminium in maize. **Plant and Soil**, [s. l.], v.151, p.97-104, 1993.
- DYBZINSKI, R. *et al.* Soil fertility increases with plant species diversity in a long-term biodiversity experiment. **Oecologia**, [s. l.], v.158, p.85-93, 2008.
- EISENHUT, M. *et al.* Photorespiration is crucial for dynamic response of photosynthetic metabolism and stomatal movement to altered  $\text{CO}_2$  availability. **Molecular plant**, [s. l.], v.10, n.1, p.47-61, 2017.
- EJAZ, S. *et al.* Role of osmolytes in the mechanisms of antioxidant defense of plants. **Sustainable Agriculture Reviews**, [s. l.], v.39, p.95-117, 2020.
- ESTEBAN, R. *et al.* Mechanisms of ammonium toxicity and the quest for tolerance. **Plant Science**, [s. l.], v. 248, p. 92-101, 2016.
- FAGERIA, N.K.; BALIGAR, V. C. Melhorando a eficiência do uso de nutrientes de culturas anuais em solos ácidos brasileiros para produção de culturas sustentáveis, **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, [s. l.], v.32, n.7-8, p.1303-1319, 2001.

- FAN, X. *et al.* Plant nitrate transporters: from gene function to application. **Journal of Experimental Botany**, [s. l.], v. 68, n. 10, p. 2463-2475, 2017.
- FANG, X. Z. *et al.* Alleviation of proton toxicity by nitrate uptake specifically depends on nitrate transporter 1.1 in Arabidopsis. **New Phytologist**, [s. l.], v.211, n.1, p.149-158, 2016.
- FENG, Q. *et al.* Physiological and TMT-based quantitative proteomic responses of barley to aluminium stress under phosphorus-Piriformospora indica interaction. **Plant Physiology and Biochemistry**, [s. l.], v.196, p.634-646, 2023.
- FERRARIO, S. *et al.* Effects of constitutive expression of nitrate reductase in transgenic *Nicotiana plumbaginifolia* L. in response to varying nitrogen supply. **Planta**, [s. l.], v.196, p.288-294, 1995.
- FLEMING, A. L. Ammonium Uptake by Wheat Varieties Differing in Al Tolerance 1. **Agronomy Journal**, [s. l.], v.75, n.5, p.726-730, 1983.
- FORNARO, A.; GUTZ, I. G. R. Wet deposition and related atmospheric chemistry in the São Paulo metropolis, Brazil: Part 2 – contribution of formic and acetic acids. **Atmospheric Environment**, [s. l.], v. 37, n. 1, p. 117-128, 2003.
- FREITAS-SILVA, L. de; CASTRO, N. D.; CAMPOS DA SILVA, L. Morphoanatomical and biochemical changes in *Zeyheria tuberculosa* exposed to glyphosate drift. **Botany**, [s. l.], v. 99, n. 2, p. 91-98, 2021.
- FU, Z. *et al.* Proanthocyanidin-Aluminum Complexes Improve Aluminum Resistance and Detoxification of *Camellia sinensis*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 68, n. 30, p. 7861-7869, 2020.
- GAO, C.; ZHANG, T. Eutrophication in a Chinese context: understanding various physical and socio-economic aspects. **Ambio**, [s. l.], v.39, p.385-393, 2010.
- GAVASSI, M. A. *et al.* NCED expression is related to increased ABA biosynthesis and stomatal closure under aluminum stress. **Environmental and Experimental Botany**, [s. l.], v.185, p.104404, 2021.
- GIANNOPOLITIS, C. N; RIES, S. K. Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants. **Plant physiology**, [s. l.], v. 59, n. 2, p. 309-314, 1977.
- GROAT, R. G; VANCE, C. P. Root nodule enzymes of ammonia assimilation in alfalfa (*Medicago sativa* L.): developmental patterns and response to applied nitrogen. **Plant Physiology**, [s. l.], v. 67, n. 6, 1198-1203, 1981.
- GUO, P. *et al.* Aluminum effects on photosynthesis, reactive oxygen species and methylglyoxal detoxification in two *Citrus* species differing in aluminum tolerance. **Tree physiology**, [s. l.], v. 38, n. 10, p. 1548-1565, 2018.
- HAO, T. *et al.* Impacts of nitrogen fertilizer type and application rate on soil acidification rate under a wheat-maize double cropping system. **Journal of environmental management**, [s. l.], v.270, p.110888, 2020.

- HAVIR, E. A; MCHALE, N. A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. **Plant Physiology**, [s. l.], v. 84, n. 2, p. 450-455, 1987.
- HAWKINS, B. J.; ROBBINS, S. pH affects ammonium, nitrate and proton fluxes in the apical region of conifer and soybean roots. **Physiologia Plantarum**, [s. l.], v. 138, p. 238-247, 2010.
- HAYATSU, M.; TAGO, K.; SAITO, M. Various players in the nitrogen cycle: diversity and functions of the microorganisms involved in nitrification and denitrification. **Soil Science and Plant Nutrition**, [s. l.], v.54, n.1, p.33-45, 2008.
- HEYDARI, M. *et al.* Linkage between plant species diversity and soil-based functions along a post-agricultural succession is influenced by the vegetative forms. **Environmental Monitoring and Assessment**, [s. l.], v.192, p.1-16, 2020.
- HIKOSAKA, K. Interspecific difference in the photosynthesis–nitrogen relationship: patterns, physiological causes, and ecological importance. **Journal of plant research**, [s. l.], v.117, p.481-494, 2004.
- HOFFMAN, B. M. *et al.* Mechanism of nitrogen fixation by nitrogenase: the next stage. **Chemical reviews**, [s. l.], v.114, n.8, p.4041-4062, 2014.
- HUANG, W. J.; ZHOU, G. Y.; LIU, J. X. Nitrogen and phosphorus status and their influence on aboveground production under increasing nitrogen deposition in three successional forests. **Acta Oecologica**, [s. l.], v.44, p.20-27, 2012.
- IQBAL, A. *et al.* Untangling the molecular mechanisms and functions of nitrate to improve nitrogen use efficiency. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, [s. l.], v.100, n.3, p.904-914, 2020.
- JAMAI *et al.*, *Arabidopsis* photorespiratory serine hydroxymethyltransferase activity requires the mitochondrial accumulation of ferredoxin-dependent glutamate synthase. **The Plant Cell**, [s. l.], v.21, n.2, p.595–606, 2009
- JAQUETTI, R. K. *et al.* Coordinated adjustments of carbohydrates and growth of tree legumes under different fertilization regimes in degraded areas in Amazonia. **New Forests**, [s. l.], v.53, n.2, p.221-240, 2022.
- JAQUETTI, R. K., *et al.* Adubação e influência da sazonalidade no desempenho fotoquímico de leguminosas arbóreas em plantios florestais para recuperação de área na Amazônia. **PLoS ONE**, San Francisco, v.16, n.5, p. e0243118, 2021.
- JASKOWIAK, J. *et al.* Analysis of aluminum toxicity in *Hordeum vulgare* roots with an emphasis on DNA integrity and cell cycle. **PLoS One**, [s. l.], v. 13, n. 2, p. e0193156, 2018.
- Jl, Y. *et al.* Roles of cytosolic glutamine synthetases in *Arabidopsis* development and stress responses. **Plant and Cell Physiology**, [s. l.], v.60, n.3, p.657-671, 2019.
- JIANG, D. *et al.* Silicon mediated redox homeostasis in the root-apex transition zone of rice plays a key role in aluminum tolerance. **Plant Physiology and Biochemistry**, [s. l.], v.201, p.107871, 2023.

KARIMAEI, M.; POOZESH, V.; REZAEI, A. Evaluation of Aluminum toxicity and phosphorus treatment on the physiological and biochemical traits of spinach (*Spinacia oleracea* L.). **Scientia Horticulturae**, [s. l.], v.298, p.110981, 2022.

KAUR, H. *et al.* The beneficial roles of trace and ultratrace elements in plants. **Plant Growth Regulation**, [s. l.], v.100, n.2, p.219-236, 2023.

KERTÉSZ, S. Changes in glutamine synthetase activity in presence of aluminium complexes. **Acta Biologica Szegediensis**, [s. l.], v.46, n.3-4, p.103-104, 2002.

KIM, J. Y. *et al.* Ammonium inhibits chromomethylase 3-mediated methylation of the *Arabidopsis* nitrate reductase gene *NIA2*. **Frontiers in Plant Science**, [s. l.], v.6, p.1161, 2016.

KIM, J. Y. *et al.* Nitrate reductases are relocalized to the nucleus by AtSIZ1 and their levels are negatively regulated by COP1 and ammonium. **International journal of molecular sciences**, [s. l.], v.19, n.4, p.1202, 2018.

KIRSCHT, A. *et al.* Crystal structure of an ammonia-permeable aquaporin. **PLoS biology**, [s. l.], v. 14, n. 3, p. e1002411, 2016.

KONISHI, M.; YANAGISAWA, S. Roles of the transcriptional regulation mediated by the nitrate-responsive cis-element in higher plants. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [s. l.], v.411, n.4, p.708-713, 2011.

KROUK, G. A. *et al.* framework integrating plant growth with hormones and nutrients. **Trends in plant science**, [s. l.], v.16, n.4, p.178-182, 2011.

KUMAR, S.; KUMAR, S.; MOHAPATRA, T. Interaction between macro-and micro-nutrients in plants. **Frontiers in Plant Science**, [s. l.], v.12, p.665583, 2021.

KUSANO, M. *et al.* Metabolomic approaches toward understanding nitrogen metabolism in plants. **Journal of Experimental Botany**, [s. l.], v.62, n.4, p.1439-1453, 2011.

LALIBERTÉ, E. *et al.* How does pedogenesis drive plant diversity?. **Trends in ecology & evolution**, [s. l.], v.28, n.6, p.331-340, 2013.

LEWIS, N. H. C.; FLEMING, G. R. Two-dimensional electronic-vibrational spectroscopy of chlorophyll a and b. **The journal of physical chemistry letters**, [s. l.], v.7, n.5, p.831-837, 2016.

LI, R. *et al.* Investment of needle nitrogen to photosynthesis controls the nonlinear productivity response of young Chinese fir trees to nitrogen deposition. **Science of The Total Environment**, [s. l.], v.840, p.156537, 2022.

LI, S. Novel insight into functions of ascorbate peroxidase in higher plants: More than a simple antioxidant enzyme. **Redox Biology**, [s. l.], v.64, p. 102789, 2023.

LI, Y. *et al.* Effect of post-silking drought on nitrogen partitioning and gene expression patterns of glutamine synthetase and asparagine synthetase in two maize (*Zea mays* L.) varieties. **Plant Physiology and Biochemistry**, [s. l.], v.102, p.62-69, 2016.



- LI, Z. *et al.* Reduced application of nitrogen fertilizer affects the carbon metabolism of leaves and maintains the number of flowers in *Coreopsis tinctoria*. **Journal of Plant Growth Regulation**, [s. l.], v.42, n.2, p.922-934, 2023.
- LINKA, M.; WEBER, A. P. M. Shuffling ammonia between mitochondria and plastids during photorespiration. **Trends in Plant Science**, [s. l.], v.10, n.10, p.461-465, 2005.
- LICHTENTHALER, H. K; BUSCHMANN, C. Chlorophylls and carotenoids: Measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy. **Current protocols in food analytical chemistry**, [s. l.], v. 1, n. 1, p. 4-3, 2001.
- LIN, Q. *et al.* Aluminum phytotoxicity induced structural and ultrastructural changes in submerged plant *Vallisneria natans*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [s. l.], v.250, p.114484, 2023.
- LIN, Q. *et al.* Response of *Vallisneria natans* to aluminum phytotoxicity and their synergistic effect on nitrogen, phosphorus change in sediments. **Journal of Hazardous Materials**, [s. l.], v.400, p.123167, 2020.
- LIU, X. *et al.* Plant diversity and species turnover co-regulate soil nitrogen and phosphorus availability in Dinghushan forests, southern China. **Plant and Soil**, [s. l.], v.464, p.257-272, 2021.
- MALAVOLTA, E. **Elementos de nutrição mineral de plantas**. Editora Agronômica Ceres, 251p., 1980.
- MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. de. Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações. 1997. 2ª ed. Piracicaba: POTAFOS, 1997.
- MALIK, B. *et al.* Lead and aluminium-induced oxidative stress and alteration in the activities of antioxidant enzymes in chicory plants. **Scientia Horticulturae**, [s. l.], v.278, p.109847, 2021.
- MARTINELLI, G.; MORAES, M. A. **Livro vermelho da flora do Brasil**. 2013.
- MASAKAZU T. *et al.* *Arabidopsis thaliana* GLN2-encoded glutamine synthetase is dual targeted to leaf mitochondria and chloroplasts, **The Plant Cell**, [s. l.], v.16, n.8, p.2048–2058, 2004.
- MEDEIROS, R.; L.; S. de *et al.* Abiotic stress on seed germination and plant growth of *Zeyheria tuberculosa*. **Journal of Forestry Research**, [s. l.], v.34, p. 1511–1522, 2023.
- MEIER, I. C.; LEUSCHNER, C. Leaf size and leaf area index in *Fagus sylvatica* forests: competing effects of precipitation, temperature, and nitrogen availability. **Ecosystems**, [s. l.], v.11, p.655-669, 2008.
- MIGLIAVACCA, D. *et al.* Study of chemical elements in atmospheric precipitation in South Brazil. **Atmospheric Environment**, [s. l.], v. 38, n. 11, pp. 1641-1656, 2004.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical chemistry**, [s. l.], v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MISHRA, P.; DUBEY, R. S. Nickel and Al-excess inhibit nitrate reductase but upregulate activities of aminating glutamate dehydrogenase and aminotransferases in growing rice seedlings. **Plant Growth Regulation**, [s. l.], v.64, p.251-261, 2011.

MORITA, A.; OHTA, M.; YONEYAMA, T. Uptake, transport and assimilation of <sup>15</sup>N-nitrate and <sup>15</sup>N-ammonium in tea (*Camellia sinensis* L.) plants. **Soil Science and Plant Nutrition**, [s. l.], v.44, n.4, p.647-654, 1998.

MOTAVALLI, P. P. *et al.* Soil pH and organic C dynamics in tropical forest soils: evidence from laboratory and simulation studies. **Soil biology and biochemistry**, [s. l.], v. 27, n. 12, p. 1589-1599, 1995.

NAIK, M. S. *et al.* Chemical composition of rainwater around an industrial region in Mumbai. **Current Science**, [s. l.], v. 82, n. 9, p. 1131-1137, 2002.

NAKANO, Y; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant and Cell Physiology**, [s. l.], v. 22, n. 5, p. 867-880, 1981.

OHYAMA, T. Nitrogen as a major essential element of plants. **Nitrogen Assim. Plants**, [s. l.], v.37, p.1-17, 2010.

OSAKI, M.; WATANABE, T.; TADANO, T. Beneficial effect of aluminum on growth of plants adapted to low pH soils. **Soil Sci. Plant Nutr**, [s. l.], v.43, p.551–563, 1997.

PAL'OVE-BALANG, P.; MISTRIK, I. Effect of aluminium on nitrogen assimilation in roots of *Lotus japonicus*. **Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology**, [s. l.], v.145, n.3, p.527-531, 2011.

PANTOJA, O. High affinity ammonium transporters: molecular mechanism of action. **Frontiers in plant science**, [s. l.], v. 3, p. 34, 2012.

PÉCSVÁRADI, A. *et al.* Chloroplastic glutamine synthetase is activated by direct binding of aluminium. **Physiol. Plant.**, [s. l.], v.135, n.1, p.43-50, 2009.

PRINSI, B.; ESPEN, L. Mineral nitrogen sources differently affect root glutamine synthetase isoforms and amino acid balance among organs in maize. **BMC plant biology**, [s. l.], v.15, n.1, p.1-13, 2015.

PRSA, I. *et al.* Influence of nitrogen on leaf chlorophyll content and photosynthesis of 'Golden Delicious' apple. **Acta Agriculturae Scandinavica Section B-Soil and Plant Science**, [s. l.], v.57, n.3, p.283-289, 2007.

PURCINO, A. A. C. *et al.* Aluminum effects on nitrogen uptake and nitrogen assimilating enzymes in maize genotypes with contrasting tolerance to aluminum toxicity. **Journal of Plant Nutrition**, [s. l.], v.26, n.1, p.31-61, 2003.

QIANG, B. *et al.* Effect of nitrogen application levels on photosynthetic nitrogen distribution and use efficiency in soybean seedling leaves. **Journal of Plant Physiology**, [s. l.], v.287, p.154051, 2023.

QING, W. A. N. *et al.* Aluminum-enhanced proton release associated with plasma membrane H<sup>+</sup>-adenosine triphosphatase activity and excess cation uptake in tea (*Camellia sinensis*) plant roots. **Pedosphere**, [s. l.], v. 28, n. 5, p. 804-813, 2018.

QU, X. *et al.* Phosphorus relieves aluminum toxicity in oil tea seedlings by regulating the metabolic profiling in the roots. **Plant physiology and biochemistry**, [s. l.], v.152, p.12-22, 2020.

RAMOS, R. da S. *et al.* Atividade antimicrobiana in vitro dos extratos hexânico e etanólico das folhas de *Zeyheria tuberculosa*. **Rev Rene**, [s. l.], v. 13, n. 5, p. 1015-1024, 2012.

RATAJCZAK, L.; RATAJCZAK, W.; MAZUROWA, H. The effect of different carbon and nitrogen sources on the activity of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase in lupine embryonic axes. – **Physiologia Plantarum**, [s. l.], 5v. n. 1, p. 277-280, 1981.

RAVAZZOLO, L. *et al.* Nitrate and ammonium affect the overall maize response to nitrogen availability by triggering specific and common transcriptional signatures in roots. **International journal of molecular sciences**, [s. l.], v. 21, n. 2, p. 686, 2020.

REICH, P. B. *et al.* Nitrogen limitation constrains sustainability of ecosystem response to CO<sub>2</sub>. **Nature**, [s. l.], v.440, n.7086, p.922-925, 2006.

REICH, P. B. *et al.* Photosynthesis-nitrogen relations in Amazonian tree species: I. Patterns among species and communities. **Oecologia**, [s. l.], v.97, p.62-72, 1994.

REICH, P. B.; HOBBIE, S. E. Decade-long soil nitrogen constraint on the CO<sub>2</sub> fertilization of plant biomass. **Nature Climate Change**, [s. l.], v.3, n.3, p.278-282, 2013.

REICH, P. B.; WALTERS, M. B. Photosynthesis-nitrogen relations in Amazonian tree species: II. Variation in nitrogen vis-a-vis specific leaf area influences mass-and area-based expressions. **Oecologia**, [s. l.], v.97, p.73-81, 1994.

REICH, P.; B. *et al.* Different photosynthesis-nitrogen relations in deciduous hardwood and evergreen coniferous tree species. **Oecologia**, [s. l.], v.104, p.24-30, 1995.

REIS, G. L. *et al.* Influence of trees on soil nutrient pools in a silvopastoral system in the Brazilian Savannah. **Plant and soil**, [s. l.], v. 329, n. 1, p. 185-193, 2010.

RODRIGUES, P. M. S. *et al.* The influence of soil on vegetation structure and plant diversity in different tropical savannic and forest habitats. **Journal of Plant Ecology**, [s. l.], v.11, n.2, p.226-236, 2018.

RORISON, I. H. Nitrogen source and the tolerance of *Deschampsia flexuosa*, *Holcus lanatus* and *Bromus erectus* to aluminium during seedling growth. **The Journal of Ecology**, [s. l.], v.73, n.1, p.83-90, 1985.

RUBIO-ASENSIO, J. S. *et al.* Root strategies for nitrate assimilation. **Root Engineering: basic and applied concepts**, [s. l.], v.40, p.251-267, 2014.

RUFTY JR, T. W. *et al.* Effects of aluminium on nitrate uptake and assimilation. **Plant, Cell & Environment**, [s. l.], v.18, n.11, p.1325-1331, 1995.

- RUIZ, J. M.; BAGHOUR, M.; BRETONES, G.; BELAKBIR, A.; ROMERO, L. Nitrogen metabolism in tobacco plants (*Nicotiana tabacum* L.): role of boron as a possible regulatory factor. **International Journal of Plant Sciences**, [s. l.], v.159, n.1, 121–126, 1998.
- RUIZ, J. M.; RIVERO, R. M.; GARCIA, P. C.; BAGHOUR, M.; ROMERO, L. Role of  $\text{CaCl}_2$  in nitrate assimilation in leaves and roots of tobacco plants (*Nicotiana tabacum* L.). **Plant Science**, [s. l.], v.141 n.2, 107–115, 1999.
- SADEGHINIA, M.; KARGAR, M.; DE LA RIVA, E. G. Species richness captures plant functional and phylogenetic diversity variations along different ecosystems on the hillsides of Damavand Mountain (Iran). **Arabian Journal of Geosciences**, [s. l.], v.16, n.1, p.41, 2023.
- SARMENTO, P. de A. *et al.* Avaliação do extrato da *Zeyheria tuberculosa* na perspectiva de um produto para cicatrização de feridas. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, [s. l.], v. 22, n. 1, p. 165–172, 2014.
- SAVCI, S. Investigation of effect of chemical fertilizers on environment. **Apcbee Procedia**, [s. l.], v.1, p.287–292, 2012.
- SCHLÜTER, U. *et al.* Maize source leaf adaptation to nitrogen deficiency affects not only nitrogen and carbon metabolism but also control of phosphate homeostasis. **Plant Physiology**, [s. l.], v.160, n.3, p.1384–1406, 2012.
- SCHMIDT, M.; VELDKAMP, E.; CORRE, M. D. Tree species diversity effects on productivity, soil nutrient availability and nutrient response efficiency in a temperate deciduous forest. **Forest Ecology and Management**, [s. l.], v.338, p.114–123, 2015.
- SCHMOHL, N. *et al.* Pectin methylesterase modulates aluminium sensitivity in *Zea mays* and *Solanum tuberosum*. **Physiologia Plantarum**, [s. l.], v. 109, n. 4, p. 419–427, 2000.
- SCHULZE, E. D. *et al.* **Plant Ecology**. Second Edition. Berlin [Heidelberg]: Springer, 2019.
- SILVA, P.; MATOS, M. Assessment of the impact of Aluminum on germination, early growth and free proline content in *Lactuca sativa* L. **Ecotoxicology and environmental safety**, [s. l.], v.131, p.151–156, 2016.
- SILVEIRA, J. A. G. *et al.* Proline accumulation and glutamine synthetase activity are increased by salt-induced proteolysis in cashew leaves. **Journal of plant physiology**, [s. l.], v.160, n.2, p.115–123, 2003.
- SINGH, S. *et al.* Toxicity of aluminium on various levels of plant cells and organism: a review. **Environmental and Experimental Botany**, [s. l.], v.137, p.177–193, 2017.
- SINGH, K. K.; GHOSH, S. Regulation of glutamine synthetase isoforms in two differentially drought-tolerant rice (*Oryza sativa* L.) cultivars under water deficit conditions, **Plant Cell Reports**, [s. l.], v.32, p.183–193, 2013 .
- SKŁODOWSKA, M. *et al.* Nitrogen forms modulate effects of benzothiadiazole and arbutin on cucumber sugar metabolism. **Biologia plantarum**, [s. l.], v. 59, n. 4, p. 757–766, 2015.

- SOFO, A. *et al.* Ascorbate peroxidase and catalase activities and their genetic regulation in plants subjected to drought and salinity stresses. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v.16, n.6, p.13561-13578, 2015.
- SOUZA, C. V. *et al.* Floral biology, nectar secretion pattern and fruit set of a threatened Bignoniaceae tree from Brazilian tropical forest. **Flora**, [s. l.], v. 227, p. 46-55, 2017.
- SOUZA, M. C. de *et al.* Ecological strategies of Al-accumulating and non-accumulating functional groups from the cerrado *sensu stricto*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, [s. l.], v. 87, n. 2, p. 813-823, 2015.
- SUN, C. *et al.* Decreasing methylation of pectin caused by nitric oxide leads to higher aluminium binding in cell walls and greater aluminium sensitivity of wheat roots. **Journal of experimental botany**, [s. l.], v. 67, n. 3, p. 979-989, 2016.
- SUN, L. Aluminium is essential for root growth and development of tea plants (*Camellia sinensis*). [s. l.], v. 62, n. 7, 2020.
- TABALDI, L. A. *et al.* Micronutrient concentration in potato clones with distinct physiological sensitivity to Al stress. **Ciência Rural**, [s. l.], v.39, p.379-385, 2009.
- YONEYAMA, T.; SUZUKI, A. Exploration of nitrate-to-glutamate assimilation in non-photosynthetic roots of higher plants by studies of <sup>15</sup>N-tracing, enzymes involved, reductant supply, and nitrate signaling: A review and synthesis, **Plant Physiology and Biochemistry**, [s. l.], v.136, p.245-254, 2019.
- TANG, D. *et al.* Glutamate dehydrogenase isogenes CsGDHs cooperate with glutamine synthetase isogenes CsGSs to assimilate ammonium in tea plant (*Camellia sinensis* L.). **Plant Science**, [s. l.], v.312, p.111031, 2021.
- TEIXEIRA, J.; FIDALGO, F. Salt stress affects glutamine synthetase activity and mRNA accumulation on potato plants in an organ-dependent manner. **Plant Physiology and Biochemistry**, [s. l.], v.47, n.9, p.807-813, 2009.
- TIAN, D.; NIU, S. A global analysis of soil acidification caused by nitrogen addition. **Environmental Research Letters**, [s. l.], v.10, n.2, p.024019, 2015.
- UEXKÜLL, H. R.; MUTERT, E. Global extent, development and economic impact of acid soils. **Plant and soil**, [s. l.], v. 171, n. 1, p. 1-15, 1995.
- VAZQUEZ, A. *et al.* Does nitrogen source influence cadmium distribution in Arabidopsis plants?. **Ecotoxicology and environmental safety**, [s. l.], v. 191, p. 110163, 2020.
- VEGA-MAS, I. *et al.* Tomato roots exhibit in vivo glutamate dehydrogenase aminating capacity in response to excess ammonium supply. **Journal of plant physiology**, [s. l.], v.239, p.83-91, 2019.
- VELIKOVA, V.; YORDANOV, I.; EDREVA, A. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants: protective role of exogenous polyamines. **Plant science**, [s. l.], v.151, n. 1, p. 59-66, 2000.

VIEIRA, C. R. *et al.* Estudo comparativo de metodologias de preparo de soluções nutritivas no crescimento de mudas de paricá. **Ambiência**, [s. l.], v.13, n.2, p.373-392, 2017.

VIEIRA, E. A. *et al.* Carbon-nitrogen metabolism and oxidative stress in young plants of *Dipteryx alata* Vog. subjected to seasonal water regimes in the Cerrado. **Environmental and Experimental Botany**, [s. l.], v. 183, p. 104361, 2021.

VOSE, James M. Patterns of Leaf Area Distribution Within Crowns of Nitrogen- and Phosphorus-Fertilized Loblolly Pine Trees. **Forest Science**, v.34, n.3, p. 564–573, 1988.

WAN, B. *et al.* Molecular mechanism of linear polyphosphate adsorption on iron and aluminum oxides. **The Journal of Physical Chemistry C**, [s. l.], v.124, n.52, p.28448-28457, 2020.

WANG, F. *et al.* Adaptation to rhizosphere acidification is a necessary prerequisite for wheat (*Triticum aestivum* L.) seedling resistance to ammonium stress. **Plant Physiology and Biochemistry**, [s. l.], v. 108, p. 447-455, 2016.

WANG, F. *et al.* Higher Atmospheric CO<sub>2</sub> Levels Favor C<sub>3</sub> Plants Over C<sub>4</sub> Plants in Utilizing Ammonium as a Nitrogen Source. **Frontiers in plant science**, [s. l.], v. 11, 2020.

WANG, H. *et al.* Nitrate reductase-mediated nitric oxide production alleviates Al-induced inhibition of root elongation by regulating the ascorbate-glutathione cycle in soybean roots. **Plant and soil**, [s. l.], v.410, p.453-465, 2017.

WANG, H. *et al.* Transcriptome analysis reveals the mechanism of nitrogen fertilizers in starch synthesis and quality in waxy and non-waxy proso millet. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v.323, p.121372, 2024.

WANG, P. *et al.* Nitrate improves aluminium resistance through SLAH-mediated citrate exudation from roots. **Plant, Cell & Environment**, [s. l.], v.46, n.10, p.1-24, 2023.

WANG, R. *et al.* A genetic screen for nitrate regulatory mutants captures the nitrate transporter gene NRT1.1. **Plant physiology**, [s. l.], v.151, n.1, p.472-478, 2009.

WANG, R. *et al.* Global forest carbon uptake due to nitrogen and phosphorus deposition from 1850 to 2100. **Global change biology**, [s. l.], v.23, n.11, p.4854-4872, 2017a.

WANG, Xi. *et al.* Phosphate sorption speciation and precipitation mechanisms on amorphous aluminum hydroxide. **Soil Systems**, [s. l.], v.3, n.1, p.20, 2019.

WARREN, C. R.; DREYER, E.; ADAMS, M. A. Photosynthesis-Rubisco relationships in foliage of *Pinus sylvestris* in response to nitrogen supply and the proposed role of Rubisco and amino acids as nitrogen stores. **Trees**, [s. l.], v.17, p.359-366, 2003.

WATANABE, T. e OSAKI, M. Mechanisms of adaptation to high aluminum condition in native plant species growing in acid soils: a review, **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v.33, n.7-8, 1247–1260, 2002.

WATANABE, T.; OSAKI, M.; TADANO, T. Effects of nitrogen source and aluminum on growth of tropical tree seedlings adapted to low pH soils. **Soil Science and Plant Nutrition**, [s. l.], v.44, n.4, p.655-666, 1998.

- WEI, Y. *et al.* Recent advances in understanding mechanisms of plant tolerance and response to aluminum toxicity. **Sustainability**, [s. l.], v. 13, n. 4, p. 1782, 2021.
- WEN, B. *et al.* How does nitrate regulate plant senescence?. **Plant Physiology and Biochemistry**, [s. l.], v.157, p.60-69, 2020.
- WHITE, A. C. *et al.* How can we make plants grow faster? A source-sink perspective on growth rate. **Journal of Experimental Botany**, [s. l.], v. 67, n. 1, p. 31-45, 2016.
- WIEDER, W. R. *et al.* Future productivity and carbon storage limited by terrestrial nutrient availability. **Nature Geoscience**, [s. l.], v.8, n.6, p.441-444, 2015.
- XIAO, C. *et al.* Nitrate transporter NRT1.1 and anion channel SLAH3 form a functional unit to regulate nitrate-dependent alleviation of ammonium toxicity. **Journal of Integrative Plant Biology**, [s. l.], v.64, n.4, p.942-957, 2022.
- XU, G.; FAN, X.; MILLER, A. J. Plant nitrogen assimilation and use efficiency. **Annual review of plant biology**, [s. l.], v.63, p.153-182, 2012.
- XU, Q. *et al.* Aluminum induced metabolic responses in two tea cultivars. **Plant Physiology and Biochemistry**, [s. l.], v. 101, p. 162-172, 2016.
- YAAKOBI, A. *et al.* Growth and drought resilience of four native tree species suitable for reforestation of Brazil's Atlantic Forest. **Forestry**, [s. l.], v.96, n.4, p. 530-546, 2023.
- YAN, L.; XU, X.; XIA, J. Different impacts of external ammonium and nitrate addition on plant growth in terrestrial ecosystems: A meta-analysis. **Science of the total environment**, [s. l.], v.686, p.1010-1018, 2019.
- YANAGISAWA, S. Transcription factors involved in controlling the expression of nitrate reductase genes in higher plants. **Plant Science**, [s. l.], v.229, p.167-171, 2014.
- YANG, J.; FAN, W.; ZHENG, S. Mechanisms and regulation of aluminum-induced secretion of organic acid anions from plant roots. **Journal of Zhejiang University-SCIENCE B**, [s. l.], v. 20, n. 6, p. 513-527, 2019.
- YANG, L. *et al.* Roles of organic acid anion secretion in aluminum tolerance of higher plants. **BioMed Research International**, [s. l.], v. 2013, 2013.
- YANG, M. *et al.* Effect of low pH and aluminum toxicity on the photosynthetic characteristics of different fast-growing Eucalyptus vegetatively propagated clones. **PLoS One**, [s. l.], v. 10, n. 6, p. e0130963, 2015a.
- YANG, Q. *et al.* Natural plant inducer 2-Amino-3-Methylhexanoic acid protects physiological activity against high-temperature damage to tea (*Camellia sinensis*). **Scientia Horticulturae**, [s. l.], v.312, p.111836, 2023.
- YANG, S. *et al.* RNA-Seq analysis of differentially expressed genes in rice under varied nitrogen supplies. **Gene**, [s. l.], v. 555, n. 2, p. 305-317, 2015.

- YANG, T. *et al.* Transcriptional regulation of amino acid metabolism in response to nitrogen deficiency and nitrogen forms in tea plant root (*Camellia sinensis* L.). **Scientific Reports**, [s. l.], v.10, n.1, p.6868, 2020.
- YANG, Z. *et al.* Preferences for different nitrogen forms in three dominant plants in a semi-arid grassland under different grazing intensities. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, [s. l.], v.333, p.107959, 2022.
- YAO, B. *et al.* Influence of ammonium and nitrate supply on growth, nitrate reductase activity and N-use efficiency in a natural hybrid pine and its parents. **Journal of Plant Ecology**, v. 4, n. 4, p. 275-282, 2011.
- YEMM, E. W; COCKING, E. C. The Determination of Amino Acids with Ninhydrin. **Analyst**, [s. l.], v. 80, 209-213, 1955.
- YEMM, E; WILLIS, A. J. The estimation of carbohydrate in plant extracts by Anthrone. **Biochemical Journal**, [s. l.], v. 57, 508-514, 1954.
- YIN, H. *et al.* Effect of ammonium and nitrate supplies on nitrogen and sucrose metabolism of Cabernet Sauvignon (*Vitis vinifera* cv. Cabernet Sauvignon). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, [s. l.], v. 100, n. 14, p. 5239-5250, 2020.
- YONEYAMA, T.; SUZUKI, A. Exploration of nitrate-to-glutamate assimilation in non-photosynthetic roots of higher plants by studies of <sup>15</sup>N-tracing, enzymes involved, reductant supply, and nitrate signaling: a review and synthesis. **Plant Physiology and Biochemistry**, [s. l.], v.136, p.245-254, 2019.
- YU, Y. *et al.* Increased bound putrescine accumulation contributes to the maintenance of antioxidant enzymes and higher aluminum tolerance in wheat. **Environmental pollution**, [s. l.], v. 252, p. 941-949, 2019.
- ZENG, J. *et al.* Ammonium regulates redox homeostasis and photosynthetic ability to mitigate copper toxicity in wheat seedlings. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [s. l.], v.226, p.112825, 2021.
- ZHANG, D. *et al.* Soil degradation effects on plant diversity and nutrient in tussock meadow wetlands. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, [s. l.], v.19, p.535-544, 2019b.
- ZHANG, G.; ZHANG, Li.; WEN, D. Photosynthesis of subtropical forest species from different successional status in relation to foliar nutrients and phosphorus fractions. **Scientific Reports**, [s. l.], v.8, n.1, p.10455, 2018.
- ZHANG, H.; FORDE, B. G. Regulation of Arabidopsis root development by nitrate availability. **Journal of experimental botany**, [s. l.], v.51, n.342, p.51-59, 2000.
- ZHANG, J. *et al.* Melatonin alleviates aluminum-induced root growth inhibition by interfering with nitric oxide production in Arabidopsis. **Environmental and Experimental Botany**, [s. l.], v.161, p.157-165, 2019a.
- ZHANG, J. *et al.* The role of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase in plant responses to aluminum toxicity. **Frontiers in plant science**, [s. l.], v. 8, p. 1757, 2017.



ZHANG, L. *et al.* Polyphenol-Aluminum Complex Formation: Implications for Aluminum Tolerance in Plants. **Journal of agricultural and food chemistry**, [s. l.], v. 64, n. 15, p. 3025-3033, 2016.

ZHANG, T. *et al.* Effects of different LED sources on the growth and nitrogen metabolism of lettuce. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, [s. l.], v. 134, n. 2, p. 231-240, 2018b.

ZHANG, X. *et al.* Resource-acquisitive species have greater plasticity in leaf functional traits than resource-conservative species in response to nitrogen addition in subtropical China. **Science of The Total Environment**, [s. l.], v.903, p.166177, 2023.

ZHANG, Y. *et al.* The cell cycle checkpoint regulator ATR is required for internal aluminum toxicity-mediated root growth inhibition in Arabidopsis. **Frontiers in plant science**, [s. l.], v. 9, p. 118, 2018c.

ZHANG, Z. *et al.* Changes in plant nitrogen acquisition strategies during the restoration of spruce plantations on the eastern Tibetan Plateau, China. **Soil Biology and Biochemistry**, [s. l.], v. 119, p. 50-58, 2018a.

ZHAO, S. *et al.* Comparison with Arabidopsis reveals optimal nitrogen allocation strategy and mechanism in *Chorispora bungeana*, a cryophyte with strong freezing tolerance. **Journal of Plant Physiology**, [s. l.], v.256, p.153311, 2021.

ZHAO, X. Q. *et al.* Aluminium tolerance in rice is antagonistic with nitrate preference and synergistic with ammonium preference. **Annals of Botany**, [s. l.], v.111, n.1, p.69-77, 2013.

ZHAO, X. Q.; SHEN, R. F.. Interactive regulation of nitrogen and aluminum in rice. **Plant signaling & behavior**, [s. l.], v.8, n.6, p.69-77, 2013.

ZHAO, X. Q.; SHEN, R. F.; SUN, Q. B. Ammonium under solution culture alleviates aluminum toxicity in rice and reduces aluminum accumulation in roots compared with nitrate. **Plant and Soil**, [s. l.], v.315, p.107-121, 2009.

ZHENG, T. *et al.* Mechanisms of wheat (*Triticum aestivum*) grain storage proteins in response to nitrogen application and its impacts on processing quality. **Scientific reports**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 1-13, 2018.

ZHENG, Z. L. Carbon and nitrogen nutrient balance signaling in plants. **Plant signaling & behavior**, [s. l.], v.4, n.7, p.584-591, 2009.

ZHI, S. *et al.* Expression of glutamate dehydrogenase genes of mulberry in *Morus alba* L. and transgenic tobacco in relation to biotic and abiotic stresses. **Russian Journal of Plant Physiology**, [s. l.], v.67, p.703–714, 2020.

ZHOU, T. *et al.* Physiologic, metabolomic, and genomic investigations reveal distinct glutamine and mannose metabolism responses to ammonium toxicity in allotetraploid rapeseed genotypes. **Plant Science**, [s. l.], v.310, p.110963, 2021.

ZHOU, X. *et al.* Reactive oxygen, nitrogen, carbonyl and sulfur species and their roles in plant abiotic stress responses and tolerance. **Journal of Plant Growth Regulation**, [s. l.], v.41, p.119,142, 2022.

DELÚ-FILHO, Nelson. **Efeito do  $N-NO_3^-$  sobre o crescimento e atividade das enzimas de assimilação do nitrogênio em plantas jovens de seringueira (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.).** 1994. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1994.

CARNEIRO, M. M. L. C. **Fisiologia de plantas jovens de seringueira cultivadas em diferentes fontes nitrogenadas e sob baixa disponibilidade de água e oxigênio.** 2014. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014.

SOUZA, C. A. F. **Influência do alumínio na mobilização de reservas, nutrição mineral e crescimento de plantas de seringueira (*Hevea brasiliensis* Muell Arg.).** 1991. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras, 1991.

CARVALHO, P. A. **Metabolismo do nitrogênio e carbono em plantas de seringueira submetidas à hipoxia e diferentes fontes de nitrogênio.** 2015. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2015.

LEMO, G. B. de *et al.* Atividade das enzimas de assimilação do nitrogênio em plantas jovens de seringueira cultivadas com diferentes relações de nitrato e amônio. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, [s. l.], v. 11. n. 2, p. 113-118, 1999.

CUPERTINO, I. C. F. S. *et al.* Alterações morfofisiológicas da aplicação de metais pesados e alumínio em plantas jovens de seringueira. **Revista Eletrônica Científica da UERGS**, [s. l.], v. 2, n. 2, p. 135-144, 2016.

ZHU, C. Q. *et al.* Ammonium improved cell wall and cell membrane P reutilization and external P uptake in a putrescine and ethylene dependent pathway. **Plant Physiology and Biochemistry**, [s. l.], v.191, p.67-77, 2022.

ZINKO, U. *et al.* The role of soil pH in linking groundwater flow and plant species density in boreal forest landscapes. **Ecography**, [s. l.], v. 29, n. 4, p. 515-524, 2006.

FERREIRA, A. M. O. *et al.* Under ground: what pH favors germination and the root growth of *Zeyheria tuberculosa* (Vell.) Bureau ex Verl. **Acta Botanica Brasilica**, v. 37, p. e20230116, 2023.

## APÊNDICE

**APÊNDICE A:** Tabela de concentrações das soluções estoque utilizadas para o preparo das soluções nutritivas referentes ao experimento 1.

| Soluções estoques                                                                       | Concentrações N-NO <sub>3</sub> |               |               |                |                |
|-----------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|---------------|---------------|----------------|----------------|
|                                                                                         | 2mM<br>(mL/L)                   | 4mM<br>(mL/L) | 8mM<br>(mL/L) | 12mM<br>(mL/L) | 16mM<br>(mL/L) |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (1M)                                                    | 1                               | 1             | 1             | 1              | 1              |
| Ca (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O (1M)                              | 1                               | 2             | 2             | 3              | 4              |
| K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (0,25M)                                                  | 4                               | 5,82          | 0             | 0              | 0              |
| MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O (1M)                                               | 1,36                            | 1,8           | 2,52          | 2,52           | 3,7            |
| FeCl <sub>3</sub> 6H <sub>2</sub> O/Na <sub>2</sub> EDTA<br>(9mM)                       | 2,924                           | 2,924         | 2,924         | 2,924          | 2,924          |
| H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> (64mM)                                                   | 1                               | 1             | 1             | 1              | 1              |
| MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O (9mM)                                               | 1                               | 1             | 1             | 1              | 1              |
| ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O<br>(9,20mM)                                        | 1                               | 1             | 1             | 1              | 1              |
| CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O (9,45mM)                                           | 1                               | 1             | 1             | 1              | 1              |
| Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O (85%<br>MoO <sub>3</sub> ) (0,30mM) | 1,2                             | 1,2           | 1,2           | 1,2            | 1,2            |
| CaSO <sub>4</sub> (0,25M)                                                               | 5,5                             | 2             | 5             | 5              | 0              |
| KNO <sub>3</sub> (1M)                                                                   | 0                               | 0             | 4             | 6              | 8              |

[illegible]

|                                                                                        |   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (9,45 m<br>M)                                | 1 | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   |
| $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (85%<br>$\text{MoO}_3$ ) (0,30 mM) | 1 | 1,2 | 1,2 | 1,2 | 1,2 | 1,2 | 1,2 | 1,2 | 1,2 | 1,2 | 1,2 | 1,2 | 1,2 | 1,2 | 1,2 | 1,2 |
| $\text{CaSO}_4$ (0,25M)                                                                | 0 | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 8   | 8   | 8   |
| $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$                                                           | 0 | 0   | 0,3 | 0,6 | 0   | 0,3 | 0,6 | 0   | 0,3 | 0,6 | 0   | 0,3 | 0,6 | 0   | 0,3 | 0,6 |