



Atividade da enzima nitrato redutase em espécies arbóreas da Floresta Ombrófila Densa Submontana, Caraguatatuba, SP

Janaina Gomes da Silva^(1,2) & Marcos Pereira Marinho Aidar⁽²⁾

⁽¹⁾Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente. Instituto de Botânica, São Paulo, SP, janainagomes@ig.com.br; ⁽²⁾Núcleo de Fisiologia e Bioquímica de Plantas, Instituto de Botânica de São Paulo, São Paulo, SP.

Resumo: O nitrato é a principal forma de aquisição de nitrogênio (N) pelas plantas. A enzima nitrato redutase (NR) é responsável por catalisar a reação de transformação do nitrato em nitrito. Essa reação pode ocorrer tanto nas raízes quanto na folha, sendo que na folha a sua atividade em espécies arbóreas da Mata Atlântica foi caracterizada por apresentar alta atividade em espécies iniciais do processo de sucessão e diminuir nas espécies mais tardias. Considerando que a ciclagem de N tem sido grandemente influenciada pelas atividades antrópicas, é importante conhecer os padrões de uso de N das espécies arbóreas atuais para se entender como o aumento na sua deposição afetará o desenvolvimento dos ecossistemas florestais tropicais e a NR por ter papel central na regulação da assimilação de nitrato pode sofrer alterações no seu padrão de atividade a essa entrada de nitrogênio causada pelas atividades antrópicas. Por isso, o objetivo desse trabalho é caracterizar a atividade da NR na folha de espécies arbóreas da Floresta Ombrófila Densa Submontana e estabelecer assim bases para o acompanhamento a médio prazo das alterações causadas pelo aumento da deposição, como resultado das atividades da UTGCA/Petrobras (Unidade de Tratamento de Gás de Caraguatatuba). Foram selecionadas 36 espécies arbóreas de 12 famílias e classificadas segundo a estratégia de regeneração (pioneira, secundária inicial, secundária tardia). E a atividade potencial máxima *in vivo* da enzima NR foi quantificada. Dentre as famílias estudadas, Lauraceae apresentou todas as espécies classificadas como secundárias tardias e baixa atividade da NR e Urticaceae apresentou todas as espécies classificadas como pioneira e mostrou alta atividade da NR. Esses dados mostram que as espécies de uma mesma família tendem a apresentar comportamento semelhante quanto ao uso do N e corroboram o modelo proposto de uso de nitrogênio para espécies arbóreas da Floresta Ombrófila Densa.

Palavras-Chave: pioneira, secundária tardia, nitrato, assimilação

INTRODUÇÃO

Na maioria dos ecossistemas terrestres, o nitrogênio (N) é um elemento chave na regulação da produção, estrutura e função das populações vegetais (Näsholm et al. 1998). O nitrato (NO_3^-) é considerado a principal fonte de N mineral assimilado pelas raízes das plantas superiores (Stewart et al. 1993). A enzima nitrato redutase é responsável por catalisar a reação de transformação do nitrato em nitrito.

Aidar et al. (2003) avaliaram as características do metabolismo de N de espécies arbóreas da Floresta Ombrófila Densa e observaram que as pioneiras apresentam preferência de absorção do íon nitrato (NO_3^-) e atividade da enzima nitrato redutase (NR) relativamente alta, enquanto que as secundárias tardias têm preferência pelo íon amônio (NH_4^+) e baixa atividade da NR.

Considerando que a ciclagem de N tem sido grandemente influenciada pelas atividades antrópicas, é importante conhecer os padrões de uso de N das espécies arbóreas atuais para se entender como o aumento na sua deposição afetará o desenvolvimento dos ecossistemas florestais tropicais e a NR por ter papel central na regulação da assimilação de nitrato pode sofrer alterações no seu padrão de atividade a essa entrada de nitrogênio causada pelas atividades antrópicas.

O presente projeto tem como objetivo central caracterizar a atividade da NR na folha de espécies arbóreas da Floresta Ombrófila Densa Submontana e estabelecer assim bases para o acompanhamento a médio prazo das alterações causadas pelo aumento da deposição, como resultado das atividades da UTGCA/Petrobras (Unidade de Tratamento de Gás de Caraguatatuba).

MATERIAL E MÉTODOS

O trecho do Núcleo Caraguatatuba do Parque Estadual da Serra do Mar para a alocação de parcelas foi selecionado considerando-se a área de influência

da Usina de tratamento de gás da Petrobras (UTGCA) e o estado de conservação em trecho de Floresta Ombrófila Densa Submontana (FODS).

Dentro das parcelas todos os indivíduos foram identificados e a seleção das espécies foi realizada considerando-se as espécies com maior abundância na área, as formadoras do dossel, de famílias importantes, as já conhecidas anteriormente por serem indicadoras de ambientes ou estratégias, além de espécies adequadas para comparações entre áreas de estudo.

As espécies selecionadas foram classificadas em grupos sucessionais a partir de dados obtidos pela bibliografia consultada, sendo considerada a categorização proposta por Gandolfi (2000), em que as espécies são divididas em três grupos sucessionais (pioneira, secundária inicial e secundária tardia) e um grupo sem caracterização (não categorizadas).

Para cada espécie foram coletados três indivíduos, exceto para os que apresentavam número de indivíduos menor que três. A coleta de material vegetal foi realizada durante o período do verão e inverno.

Para a análise da atividade potencial máxima da enzima nitrato redutase, as folhas maduras dos ramos coletados foram selecionada e 0,1g foram cortado em pequenas partes e transferidos para tubos de ensaio com solução de incubação contendo tampão fosfato (K₂HPO₄ 0,1 M, 100 mM KNO₃) e 1-propanol 1% (v/v). Os tubos eram incubados por uma hora a 30°C, sob vácuo e no escuro.

Após esse período, 1 mL da solução que foi incubada foi transferido para outro tubo de ensaio contendo 1 mL de ácido sulfanílico (1%) em ácido clorídrico 1N. Sendo acrescentado em seguida 1 mL solução com corante NED (α -naphthyl ethylenediamine dihydrochloric) 1%. Depois de 30 minutos as amostras foram lidas em espectrofotometro (absorbância 540 nm), de acordo com Sterwart et al. (1986). As amostras eram analisadas em duplicata para cada indivíduo coletado.

Análise estatística

Os dados serão analisados através de teste ANOVA e Teste t ($p < 0.05$) em Software R (R Development Core Team, 2007).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Entre as espécies selecionadas para o estudo (Tabela 1), 13 espécies foram classificadas como secundárias iniciais, 16 espécies de secundárias tardias, 2 pioneiras e 5 não foram classificadas.

Sendo que *Cecropia ulei* não se encontra dentro da parcela, mas sim numa área próxima, sendo selecionada para estudo devido ao amplo conhecimento sobre o uso de nitrogênio do gênero.

Esses dados sobre a distribuição das espécies em grupos de sucessão indicam um alto grau de maturidade e conservação da vegetação devido à grande quantidade de secundárias tardias na área, confirmada também pela presença de indivíduos de grande porte.

Tabela 1. Lista de espécies coletadas nas parcelas do Parque Estadual da Serra do Mar - núcleo Caraguatubá, SP. Estratégias de regeneração (RS): pioneira (P), secundária inicial (Si), secundária tardia (St) e não caracterizadas (Nc).

Família	Espécie	Autor	RS
Asteraceae	<i>Eutima adula</i>	Martius	St
Euphorbiaceae	<i>Alchornea venicifolia</i>	(Koenig) Benth.	Si
Euphorbiaceae	<i>Alchornea glandulosa</i>	Tracy & Slocum	Si
Euphorbiaceae	<i>Alchornea tripartita</i>	(Sprague) Mull. Arg.	Si
Euphorbiaceae	<i>Mabea pinnifolia</i>	Aublert	Si
Fabaceae	<i>Albizzia pedunculata</i>	(DC.) L. Hitchc.	Nc
Fabaceae	<i>Copaifera langsdorffii</i>	Desf.	St
Fabaceae	<i>Copaifera guianensis</i>	Hayne	St
Fabaceae	<i>Humulifera coultteri</i>	L.	St
Fabaceae	<i>Humulifera guianensis</i>	Pursh	Si
Fabaceae	<i>Ipira capitata</i>	Desf.	Si
Fabaceae	<i>Ipira striata</i>	Benth.	Si
Fabaceae	<i>Pseudopiptadenia samungui</i>	Benth. Lewis & Lima	Nc
Fabaceae	<i>Tachiglossum guianense</i>	Benth.	Nc
Fabaceae	<i>Zuglitzia latifolia</i> var. <i>glaberrima</i>	Mart. Brameley & Gomes	Nc
Lauraceae	<i>Cryptocarya mandioca</i>	Meisn.	St
Lauraceae	<i>Licania americana</i>	(Nees) Kosterm.	St
Lauraceae	<i>Coccoloba dispersa</i>	(Nees) Mez	St
Lauraceae	<i>Coccoloba elegans</i>	Mez	St
Lauraceae	<i>Coccoloba sp.</i>		St
Lecythidaceae	<i>Camirana legalis</i>	Mart. Kunze	St
Melastomataceae	<i>Miconia dolabriformis</i>	(Desf.) Cogn.	Nc
Muriceae	<i>Campocarpus guianensis</i>	(DC.) Viers	Si
Muriceae	<i>Eugenia cuprea</i>	(O. Berg) Mattos	St
Muriceae	<i>Eugenia oblongata</i>	O. Berg	Si
Muriceae	<i>Gonolobus asperifolius</i>	(DC.) O. Berg	St
Muriceae	<i>Mynogaugnia myrsinoides</i>	Garbino (O. Berg)	St
Muriceae	<i>Mynogaugnia guianensis</i>	(Aubl.) DC	Si
Phyllanthaceae	<i>Muehlenbergia albomarginata</i>	Altenm.	Si
Phyllanthaceae	<i>Phyllanthus brasiliensis</i>	(L.) Hitchc.	Si
Sapotaceae	<i>Gouania venusta</i>	Garbino	Si
Sapotaceae	<i>Melastoma guianensis</i>	Aubl.	Si
Sapotaceae	<i>Chrysophyllum urubite</i>	Mart. & Eichler	St
Sapotaceae	<i>Euphorbia ramifera</i>	Mart.	St
Urticaceae	<i>Stenotaphrum secundatum</i>	Swartz	P
Urticaceae	<i>Euphorbia guianensis</i>	Aubl.	P

* Espécie coletada fora das parcelas

A atividade da enzima nitrato redutase (ANR) foi avaliada de duas formas: segundo a estratégia de sucessão (P, Si e St) e segundo as diferentes famílias.

No verão, as espécies, em geral, mostraram uma maior ANR do que no período do inverno, possivelmente relacionada com as maiores temperaturas e disponibilidade de água comum nessa estação.

Entre as pioneiras selecionadas para o estudo, *Cecropia ulei* e *Pourouma guianensis* apresentaram valor médio de atividade considerado elevado, comparando-se com os valores das espécies pertencentes aos outros grupos sucessionais (secundária inicial e secundária tardia) (Figura 2 e 3). Esse valor é semelhante ao encontrado para *Cecropia graziovii* nos trabalhos de Campos (2009) e Perreira-Silva (2008). Segundo Campos (2009), por ser uma espécie pioneira que apresenta caracteristicamente indivíduos localizados em áreas mais abertas e de maior luminosidade, a assimilação de nitrato é vantajosa apesar da sua alta demanda energética, pois o gasto energético é compensado pela maior

assimilação fotossintética. Por isso a ANR é considerada um dos principais indicativos de espécies pertencentes a esse grupo ecológico.

Entre as secundárias iniciais, há espécies com valores semelhantes as pioneiras e semelhantes as tardias, sendo um grupo menos homogêneo em relação à ANR.

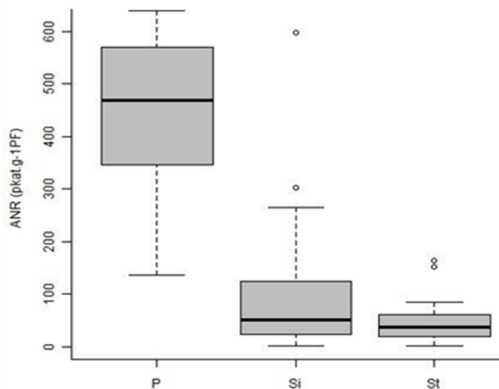


Figura 1. Boxplot da ANR no verão (pkat.g-1PF) e organizadas de acordo com a estratégia de regeneração: Pioneira (P), Secundária inicial (Si), Secundária tardia (St). A caixa central da cada bloxplot representa 50% dos valores centrais, a linha central de cada caixa representa a mediana e os extremos ou asterisco mostram os valores máximos e mínimos de cada grupo.

Todas as espécies de secundárias tardias apresentaram atividade baixa (menos que 100) da NR, se apresentando um grupo menos heterogêneo que o grupo anterior. Esta menor atividade da enzima nitrato redutase em relação ao grupo das pioneiras, esta relacionado com baixa assimilação de nitrato do solo, já que segundo Smith & Rice (1983), as espécies secundárias tardias utilizam preferencialmente o amônio como fonte primária de nitrogênio.

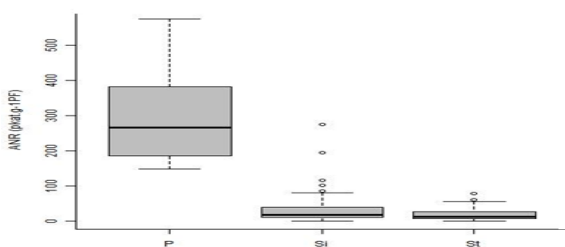


Figura 2. Boxplot da ANR no inverno (pkat.g-1PF) e organizadas de acordo com a estratégia de regeneração: Pioneira (P), Secundária inicial (Si), Secundária tardia (St).

A caixa central da cada bloxplot representa 50% dos valores centrais, a linha central de cada caixa representa a mediana e os extremos ou asterisco mostram os valores máximos e mínimos de cada grupo.

Analisando os dados a partir da comparação entre famílias (Figura 3 e 4), observa-se que elas apresentam no geral valores baixos de ANR, com exceção da família Urticaceae, em que os seus representantes com valores acima dos apresentados pelas outras famílias.

Já a família Lauraceae apresenta um comportamento oposto a Urticaceae, todas as espécies apresentaram valores médios de ANR baixos. Perreira-Silva (2008) já tinha observado esse padrão de uso de nitrato nas espécies dessa família. Sendo essa característica relacionada com o estilo de vida das espécies analisadas desse grupo, todas secundárias tardias, que apresentam preferência de uso de nitrogênio na forma de amônio.

No verão, as espécies apresentaram uma maior variação de valores dentro de cada família comparando-se com os valores obtidos no inverno. Sapindaceae foi a família que apresentou a maior variação, relacionada com a grande mudança no padrão de atividade de uma das espécies analisadas (*Matayba guianensis*).

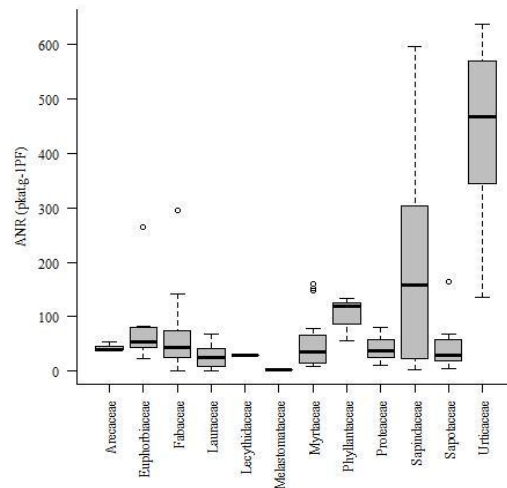


Figura 3. Boxplot da ANR (pkat.g-1PF) organizada por família no verão. A caixa central da cada bloxplot representa 50% dos valores centrais, a linha central de cada caixa representa a mediana e os extremos ou asterisco mostram os valores máximos e mínimos de cada grupo.

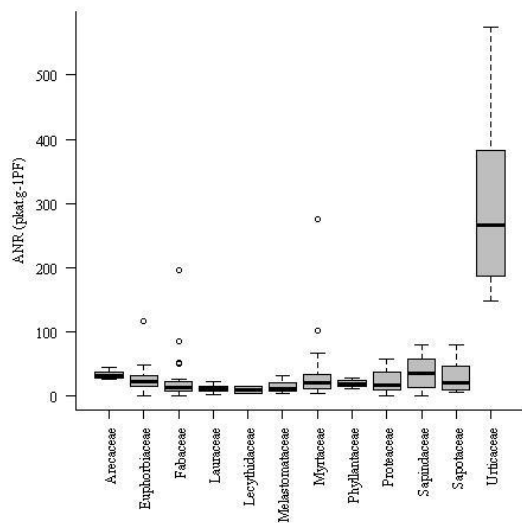


Figura 4. Boxplot da ANR (pkat.g-1PF) organizadas por família no inverno. A caixa central de cada bloxplot representa 50% dos valores centrais, a linha central de cada caixa representa a mediana e os extremos ou asterisco mostram os valores máximos e mínimos de cada grupo.

Os dados apresentados até o momento são um indicativo que o modelo proposto por Aidar (2003) sobre o uso do nitrogênio para espécies arbóreas tropicais pode ser considerado para a área de estudo. Podendo ser um parâmetro a ser utilizado na avaliação dos possíveis impactos causados pelo início das atividades UTGCA, abrangendo diferentes enfoques considerando as características de cada grupo sucessional ou família.

Perspectiva de que a atividade da nitrato redutase possa ser uma ferramenta de avaliação do impacto da construção de UTGCA sobre o metabolismo de N em espécies arbóreas

CONCLUSÕES

As espécies pioneiras apresentam maior ANR e as espécies secundárias iniciais e secundárias tardias apresentam baixa ANR.

Indicativo de que o modelo de uso de N se aplica para a FODSM de Caraguatatuba

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à FAPESP pela bolsa concedida e a todos que auxiliaram no trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aidar, M. P. M., Schmidt, S., Moss, G., Stewart, G.R. & Joly, C. A. 2003.** Nitrogen use strategies of neotropical rainforest trees in threatened Atlantic Forest. *Plant Cell and Environment* 26: 389-399.
- Campos, M.M.S. 2009.** Ecofisiologia do uso de nitrogênio em espécies arbóreas da floresta ombrófila densa das terras baixas, Ubatuba, SP. Dissertação de Mestrado, Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, São Paulo.
- Gandolfi, S. 2000.** História natural de uma floresta estacional semidecidual no município de Campinas (São Paulo, Brasil). Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo.
- Näsholm, T., Ekblad, A., Nordin, A., Giesler, R., Högberg, M. & Högberg, P. 1998.** Boreal forest plants take up organic nitrogen. *Nature* 392: 914-916.
- Pereira-Silva, E.F.L. 2008.** Estratégias ecofisiológicas no uso de nitrogênio em espécies arbóreas de floresta ombrófila densa submontana e estacional semidecidual, SP. Tese de doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- Stewart G.R., Popp M., Holzapfel I., Stewart J.I. & Dickie-Eskew A. 1986.** Localization of nitrate reduction in ferns and its relationship to environment and physiological characteristics. *New Phytologist* 104, 373-384.
- Stewart G.R., Pate J.S. & Unkovich M. 1993.** Characteristics of inorganic nitrogen assimilation of plants in fire-prone Mediterranean type vegetation. *Plant, Cell and Environment* 16: 351-363.