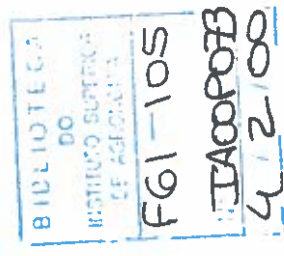


UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA
INSTITUTO SUPERIOR DE AGRONOMIA

CICLO INTERNO DO AZOTO EM ÁRVORES

Pedro César Ochoa de Carvalho



Dissertação apresentada ao
Instituto Superior de Agronomia
para o efeito de prestação de
provas de doutoramento.

Lisboa
1997

“Uma árvore disse: ‘Na minha vida oculta-se um núcleo, uma chama, um pensamento, sou vida da vida eterna. Única é a tentativa e a criação que em mim ousou a Mãe Eterna. Única é a minha forma e únicas as veias da minha pele, único o jogo mais insignificante das folhas da minha copa e a mais pequena cicatriz da minha coroa. A minha missão é dar forma e apresentar o eterno nos meus entalhes singulares’.

As árvores têm pensamentos dilatados, prolixos e serenos, assim como uma vida mais longa que a nossa.

São mais sábias que nós, embora não as escutemos.

Mas quando aprendemos a escutar as árvores, a brevidade, rapidez e pressa infantil dos nossos pensamentos adquire uma alegria sem precedentes. Quem aprendeu a escutar as árvores já não deseja ser uma árvore. Não deseja ser mais do que é”.

Hermann Hesse “O viandante”

Há certas coisas que não se aprendem rapidamente e pelas quais temos de pagar caro com a nossa única moeda - tempo. São as coisas mais simples, e porque um homem leva a vida inteira para as aprender, o pouco de novo que cada homem tira da vida é muito caro e é a única herança que tem para deixar.

E. Hemingway in "Death in the afternoon"

*Aos miúdos,
Pedro e Inês,
À Graça,
A meus pais.*

Sumário

O azoto (N) é um macronutriente que frequentemente limita a produtividade vegetal, influenciando fortemente a assimilação de carbono e o crescimento das plantas. A disponibilidade de N condiciona o desenvolvimento das folhas e das copas (área foliar), a eficiência fotossintética e desempenha um papel chave na partição da biomassa entre componentes permanentes e efêmeras, assim como entre biomassa aérea e subterrânea. As árvores crescem incorporando N a partir de várias fontes externas. Além da mineralização da matéria orgânica do solo e da fertilização azotada, a deposição atmosférica constitui uma fonte importante de azoto nos ecossistemas florestais. Alguns ecossistemas a fixação microbiana do N_2 atmosférico também é importante.

Além do N externo, o crescimento das árvores também se dá à custa de N armazenado nos próprios tecidos, através do ciclo interno. Este processo inclui nas espécies das zonas temperadas e boreais o armazenamento sazonal de N, seguido de remobilização durante os períodos de crescimento. O ciclo interno dos nutrientes permite que o ritmo sazonal de crescimento seja independente da absorção (aquisição) de nutrientes pelas árvores e pode contribuir com uma parte importante e significativa das necessidades anuais de azoto para o crescimento. O ciclo interno deve também ser considerado como factor determinante da resposta de longo prazo à aplicação de fertilizantes em termos de crescimento das árvores.

No presente trabalho os processos do ciclo interno do azoto foram quantificados em espécies arbóreas que diferem no crescimento e na fenologia: Eucalipto (*Eucalyptus globulus* Labill.), espécie perenifolia de rápido crescimento, Sobreiro (*Quercus suber* L.), espécie perenifolia de crescimento mais lento, e Freixo (*Fraxinus angustifolia* Vahl.), uma folhosa de folha caduca. Árvores jovens foram plantadas em vasos com areia e regadas com soluções nutritivas contendo concentrações contrastantes de NH_4NO_3 , permitindo o pré-condicionamento das plantas quanto ao seu teor de azoto e diferenças no crescimento e induzindo diferentes capacidades de armazenamento e de reciclagem interna de azoto. Para quantificar o ciclo interno do azoto utilizaram-se técnicas de marcação com o isótopo ^{15}N para distinguir o azoto remobilizado do azoto absorvido pelas raízes. Os processos do ciclo interno do azoto foram estudados em relação à fertilização azotada em eucalipto e sobreiro; e em relação ao CO_2 elevado em freixo.

Palavras-chave: Ciclo interno do azoto, armazenamento do N, remobilização do N, CO_2 elevado, árvores.

Abstract

Nitrogen (N) is a macronutrient that often limits plant productivity, strongly affecting carbon assimilation and plant growth. N availability for plants conditions leaf growth and crown development (foliar area) as well as photosynthetic efficiency and plays a key role in biomass partitioning either between ephemeral and permanent components or aerial and subterranean components. As they grow, trees incorporate N from several external sources. Soil organic matter mineralization, N fertilization and atmospheric deposition are all important sources of N in forest ecosystems. In some cases biological N-fixing is also important.

Besides external N sources, trees also use N stored in their own tissues to grow, through the process of internal cycling. In temperate and boreal zone species, this includes seasonal storage of N, followed by remobilization during growth periods. Internal cycling allows the seasonal growth of trees to be independent of nutrient uptake and can contribute with a significant portion of the annual growth requirements of N. Internal cycling must also be considered as a determinant factor to explain long-term responses to fertilizer application by the trees.

In the present work the processes of internal cycling of N were quantified in tree species presenting different growth rates and phenology: blue-gum (*Eucalyptus globulus* Labill.), a fast growing, evergreen species; cork-oak (*Quercus suber* L.), also evergreen, but slower growing and ash (*Fraxinus angustifolia* Vahl.) a deciduous, riparian species. Young trees were grown in sand culture and fertilized with nutrient solutions containing contrasting concentrations of NH_4NO_3 allowing the plants to grow at different rates and have different amounts of nitrogen, and consequently preconditioning the storage and recycling capacity of the trees. Isotope labelling techniques were used to quantify the internal cycling of N. ^{15}N labelling allowed for the direct quantification of remobilization or uptake of N in the trees. Internal cycling of N were studied in relation to nitrogen supply in *Eucalyptus globulus* and *Quercus suber*; and in relation to elevated CO_2 in *Fraxinus angustifolia*.

Key-words: Internal cycling of N, N storage, N remobilization, elevated CO_2 , trees.

6.3.2 Remobilização de N	97
6.3.3 Aquisição de N pelas raízes	100
6.4 Discussão	102
7. Influência do CO₂ elevado e da nutrição azotada no crescimento e remobilização do N em plantas de <i>Fraxinus angustifolia</i> Vahl.	105
7.1 Introdução	105
7.2 Material vegetal e condições experimentais	108
7.3 Resultados	109
7.3.1 Crescimento das árvores	109
7.3.2 N nas árvores (distribuição e concentração)	112
7.3.3 Remobilização do N	112
7.4 Discussão	115
8. Conclusões	119
Referências bibliográficas	123

1 Introdução

As árvores possuem algumas características próprias que justificam uma abordagem específica. Em primeiro lugar, as dimensões que atingem, tornando-as elementos dominantes e caracterizadores de diversos tipos de ecossistemas terrestres; a sua longevidade e complexidade da organização estrutural, que condicionam a acumulação de quantidades consideráveis de biomassa num processo que compreende a síntese de tecidos secundários e que reflecte a acção dos factores ambientais que influenciam o crescimento, tais como a radiação solar, os nutrientes minerais, a água, e a composição da atmosfera. Nas árvores, como noutras plantas perenes, a partição da biomassa pelos diversos tecidos, ou órgãos, assume grande importância no crescimento e nos padrões de utilização dos recursos referidos acima.

O azoto (N) é um macronutriente que frequentemente limita a produtividade vegetal, influenciando fortemente a assimilação de carbono e o crescimento das plantas. A disponibilidade de N condiciona o desenvolvimento das folhas e das copas (área foliar), a eficiência fotossintética e desempenha um papel chave na partição da biomassa entre componentes permanentes e efémeras, assim como entre biomassa aérea e subterrânea. As árvores crescem incorporando N a partir de várias fontes externas. Além da mineralização da matéria orgânica do solo e da fertilização azotada, a deposição atmosférica constitui uma fonte importante de azoto nos ecossistemas florestais, ao ponto de se atribuírem fenómenos de declínio das florestas a efeitos de saturação dos solos com N proveniente da poluição atmosférica. Nalguns ecossistemas a fixação microbiana do N₂ atmosférico também é importante.

Além do N externo, o crescimento das árvores também se dá à custa de N armazenado nos próprios tecidos, através do ciclo interno. Este processo inclui nas espécies das zonas temperadas e boreais o armazenamento sazonal de N, seguido de remobilização durante os períodos de crescimento. O ciclo interno dos nutrientes permite que o ritmo sazonal de crescimento seja independente da absorção (aquisição) de nutrientes pelas árvores e pode contribuir com uma parte importante e significativa

das necessidades anuais de azoto para o crescimento. O ciclo interno deve também ser considerado como factor determinante da resposta de longo prazo à aplicação de fertilizantes em termos de crescimento das árvores.

Assim, para desenvolver estratégias sustentadas de gestão e condução das florestas e das árvores é necessário compreender como estas acções bem como os factores ambientais afectam os processos de ciclo interno do N. Esta questão ganha importância no contexto das alterações recentes dos padrões de ocupação da terra na Europa, que tem como consequência o aumento das situações e do número de sistemas de que as árvores e a floresta são parte integrante, em contraste com a situação anterior, em que as florestas eram formas de ocupação dos solos marginais para a agricultura. Hoje, as árvores e as florestas ocupam uma posição primordial nas opções de ordenamento do território tanto nas áreas típicas e tradicionalmente florestais como nas áreas agrícolas em sistemas agro-florestais; e mesmo nas zonas urbanas, a chamada floresta urbana constitui já um elemento fundamental da qualidade de vida das populações citadinas. Consequentemente, as árvores e as florestas desenvolvem-se hoje em situações que correspondem a uma gama alargada de solos com níveis de fertilidade variados e já não somente em solos de baixa fertilidade tidos até recentemente como tipicamente florestais. É necessário compreender o impacto destas acções no ciclo interno dos nutrientes, particularmente do azoto. Sem isso é impossível determinar a sustentabilidade de ecossistemas em que a componente arbórea é fundamental perante alterações nas práticas de gestão e condução bem como a alterações ambientais de carácter global, tais como a elevação da concentração de CO₂ na atmosfera.

A importância do ciclo interno do N para o crescimento das árvores e desenvolvimento das florestas, tem sido reconhecida em estudos de balanços de nutrientes levados a cabo em ensaios de campo em florestas de coníferas e de folhosas. A importância do ciclo interno do N para o crescimento das árvores aumenta com a idade, à medida que a capacidade de armazenamento de N aumenta. Assim, o impacto das actividades de gestão florestal, e dos factores ambientais sobre o ciclo interno do N, deverá ser mediada por alterações no crescimento e partição do N e do C, que influenciam a capacidade de armazenamento das árvores.

A utilização do isótopo ¹⁵N em ensaios com árvores novas, de pequenas dimensões, em vasos de areia, permitiu avaliar quantitativamente a importância do ciclo interno do N para o crescimento anual das árvores, incluindo as raízes, bem como a interacção do ciclo interno do N com outros factores ambientais. Permitiu além disso,

constatar que também nas árvores novas, de pequenas dimensões, o ciclo interno do N pode contribuir de forma significativa para o crescimento.

Este trabalho tem como objectivos (a) proceder a uma revisão actualizada de conhecimentos sobre o ciclo do azoto nas florestas e o ciclo interno do N nas árvores e sua importância na ecologia florestal (capítulo 2); (b) estabelecer e conduzir uma série de ensaios utilizando o isótopo ¹⁵N, para estudar os processos do ciclo interno do azoto em espécies com fenologias contrastantes tais como *Eucalyptus globulus*, uma folhosa de folha persistente e crescimento rápido, *Quercus suber*, uma folhosa de folha persistente mas de crescimento lento e *Fraxinus angustifolia*, uma folhosa de folha caduca (capítulos 4, 5, 6 e 7); (c) estudar a importância do ciclo interno e sua interacção com diferentes níveis de fertilização azotada em *Eucalyptus globulus* e *Quercus suber* (capítulos 4, 5 e 6), avaliando os seus efeitos na capacidade fotossintética (capítulo 5) e eficiência do uso do azoto em *Eucalyptus globulus* (capítulo 4 e 5); (d) identificar compostos de armazenamento de N envolvidos no ciclo interno de N em *Eucalyptus globulus* (capítulo 5) (e) estudar a interacção do ciclo interno do N com o CO₂ elevado em *Fraxinus angustifolia* (capítulo 7). Esta abordagem permitiu estudar alguns aspectos do ciclo interno do azoto em espécies possuidoras de fenologias contrastantes que constituem parcelas importantes de diferentes ocupações florestais em Portugal, nomeadamente, plantações florestais com espécies de crescimento rápido (*Eucalyptus globulus*), sistemas agro-florestais ou silvo-pastoris (*Quercus suber* e *Fraxinus angustifolia*) e floresta de compartimentação, arborização de linhas de água, floresta urbana (*Fraxinus angustifolia*).

Europa e da América do Norte (Reichle, 1981 cit. por Tamm, 1995). Em 1979, realizou-se uma conferência em Syracuse, Nova York, acerca dos efeitos das operações de exploração florestal intensiva sobre os ciclos de nutrientes (Anon, 1979). Nessa conferência revelou-se uma grande dificuldade em determinar os efeitos dinâmicos da remoção de nutrientes das florestas sobre as condições de sustentabilidade de longo-prazo, apesar da grande quantidade acumulada de informação sobre o assunto. Detectaram-se deficiências de conhecimento, sobretudo no estudo da dinâmica dos sistemas radiculares, no estudo das relações entre ciclos de nutrientes e disponibilidade destes e, por último, nos estudos de longo-prazo (Attiwill e Adams, 1993).

Outra abordagem ao estudo dos ciclos de nutrientes a merecer uma referência breve é a utilização de pequenas bacias hidrográficas experimentais para estudar a dinâmica dos nutrientes num ecossistema florestal (Bormann e Likens, 1979). O objectivo deste estudo era apresentar uma visão integrada da estrutura e dos processos que determinam o balanço de nutrientes no ecossistema e os efeitos das alterações provocadas por cortes rasos no desenvolvimento de uma floresta de folhosas, situada na Nova Inglaterra (E.U.A.).

2.1.2 Dinâmica dos nutrientes nos ecossistemas florestais

A dinâmica dos nutrientes minerais nos ecossistemas florestais é um dos aspectos fundamentais associados ao desenvolvimento desses ecossistemas (Cole e Rapp, 1981). Enquanto a energia "flui" através dos elementos do ecossistema, os elementos químicos envolvidos sofrem transformações químicas e bioquímicas que determinam um padrão cíclico (de formas químicas inorgânicas para formas orgânicas e vice-versa) (Kimmins, 1997). Switzer e Nelson (1972), numa abordagem frequentemente referida na bibliografia posterior referente aos ciclos de nutrientes (Landsberg, 1986; Attiwill e Adams, 1993; Kimmins, 1997), identificaram três tipos de movimentos cíclicos dos diferentes nutrientes minerais nas florestas:

(1) Ciclo geoquímico, que inclui as perdas e ganhos de nutrientes pelo ecossistema. Estes processos decorrem a ritmos lentos em comparação com o crescimento das árvores, mas a manutenção da capacidade de produção a longo prazo de uma floresta está, em última instância, dependente deste balanço. A remoção de nutrientes minerais que ocorre em fenómenos de erosão, lavagem e leixiviação, trocas gasosas e nas operações

de abate e extracção das árvores deve ser compensada pela aquisição de nutrientes através da precipitação atmosférica e meteorização ou alteração das rochas.

(2) Ciclo biogeoquímico, inclui as relações solo-planta no seio do ecossistema, envolvendo as trocas contínuas entre os seres vivos e ambiente físico, desde que os nutrientes entram no ecossistema até à sua saída. Estão incluídos nesta categoria os processos de absorção ou aquisição de nutrientes pelas plantas a partir da solução do solo e por simbiose (micorrizas, *Rhizobium*); os processos de perda de nutrientes pelas plantas, como a lavagem das superfícies das copas pela água da chuva, a desfolha por herbívoros e a queda de folhada; a decomposição da folhada, e resultante libertação de nutrientes para o solo, dependente da actividade microbiológica e da fauna do solo.

(3) Ciclo "bioquímico", ou ciclo interno, inclui transferências internas (redistribuição) de nutrientes entre órgãos ou componentes da biomassa das árvores. Parte das necessidades nutritivas das plantas podem ser satisfeitas a partir da redistribuição dos nutrientes minerais armazenados na biomassa e neste sentido, o ciclo interno constitui um mecanismo importante pelo qual as plantas conservam nutrientes (Kimmins, 1997).

A importância relativa dos processos referidos acima varia com os nutrientes considerados, com a espécie e idade das árvores e com o estado de desenvolvimento do coberto arbóreo (Kimmins, 1994).

O estudo dos ciclos de nutrientes das florestas é uma parte importante da análise do seu desenvolvimento, permitindo abordar questões relacionadas com a nutrição mineral e eficiência do uso de nutrientes pelas espécies florestais, bem como avaliar as condições de sustentabilidade dos ecossistemas florestais e dos sistemas de produção florestal, nomeadamente na manutenção da produtividade de longo-prazo em condições de produção florestal intensiva (Johnson, 1994), mas também das condições de estabilidade ligadas à qualidade ambiental (paisagem, biodiversidade, etc.) (Neary and Hornbeck, 1994), incluindo as componentes ecológica, económica e social (Tamm, 1995). Num contexto de alterações ambientais provocadas pelo aumento da poluição e da concentração de CO₂ atmosféricas, o estudo dos ciclos de nutrientes deverá permitir a selecção e implementação de estratégias apropriadas de gestão das florestas no sentido de diminuir os impactos negativos que possam ocorrer devido a essas alterações (Nilsson et al. 1995).

2.1.3 Alterações nos ciclos de nutrientes com o desenvolvimento do coberto florestal

O crescimento das árvores, em condições de limitação por nutrientes minerais, está relacionado com a possibilidade de aumentar as entradas de nutrientes no solo (por exemplo, aumentando a interceptação de nutrientes pelo copado), de maximizar a sua retenção no ecossistema (decomposição da folhada) e de assegurar a conservação e reutilização de elementos dentro da árvore (ciclo interno). A importância relativa de cada um destes mecanismos varia entre elementos minerais e modifica-se à medida que o povoamento florestal se desenvolve (Miller, 1984). Miller (1979, 1981a, 1981b, 1984), estudando povoamentos puros, equienios, de uma conífera (*Pinus nigra* var. *maritima*) e Attiwill (1979, 1981), estudando florestas de eucalipto (*Eucalyptus obliqua*), na Austrália, definiram estádios do crescimento e desenvolvimento das florestas correspondentes a diferenças nos processos que contribuem para as necessidades nutricionais das árvores bem como para a distribuição e armazenamento de nutrientes.

O primeiro estágio (I) corresponde à expansão das copas, sendo necessárias grandes quantidades de nutrientes para o crescimento rápido de folhas e raízes finas. Desta quantidade somente uma pequena parte é proveniente da queda de folhada, sendo a disponibilidade de nutrientes no solo um factor crítico na expansão das copas. Neste caso, podem esperar-se respostas significativas do crescimento à aplicação de fertilizantes. As árvores não possuem ainda nesta fase um sistema radicular muito desenvolvido e domina a competição interespecífica por nutrientes do solo.

O segundo estágio (II) ocorre após o fecho do copado, atingido o máximo desenvolvimento da biomassa foliar, e corresponde a uma fase de captura e retenção eficiente de nutrientes pelas copas (maior área foliar e consequente capacidade de interceptação). Verifica-se imobilização de nutrientes nas componentes lenhosas da biomassa das árvores, cuja importância relativa aumentou. Embora as necessidades de nutrientes sejam altas, a maior parte dessas necessidades é satisfeita a partir da reciclagem interna e externa de nutrientes, uma vez que a quantidade de folhas formadas é igual ou inferior à queda de folhas mais antigas (Miller, 1995). Neste contexto, as exigências de nutrientes provenientes do solo são menores, tornando a ocorrência de deficiências improvável. A resposta à aplicação de fertilizantes é também pequena ou improvável. Uma diferença essencial entre os estádios I e II é a importância dos surtos

de formação de biomassa foliar. Assim, se ocorrer um desbaste ou um ataque de insectos desfolhadores, reduzindo a biomassa foliar, seguir-se-á um surto de crescimento semelhante a um retorno ao estágio I. Neste caso, passam a existir condições para que se verifique uma resposta positiva a uma fertilização.

O terceiro estágio (III) pode ou não chegar a verificar-se, e corresponde à imobilização de nutrientes na matéria orgânica do solo, devido à acumulação de folhada e à libertação lenta de nutrientes, podendo dar origem a deficiências de nutrientes se os solos forem pobres (por exemplo, em azoto). Estas situações poderão ocorrer se as revoluções forem suficientemente longas e se os factores ambientais favorecerem baixas taxas de mineralização da matéria orgânica.

Miller (1984, 1995) conclui, a partir do modelo exposto, que árvores mais velhas podem satisfazer grande parte das necessidades de nutrientes através da retranslocação. Assim, as taxas de absorção de nutrientes a partir do solo não são muito diferentes entre pinheiros (*Pinus nigra* var. *maritima*) de 10 e de 40 anos, apesar das maiores necessidades dos últimos (Miller, 1984). Além disso, as árvores mais velhas libertam uma maior proporção da sua aquisição anual de nutrientes com a folhada (ciclo biogeoquímico). Devido ao desenvolvimento destes ciclos (interno e externo) e ainda devido à maior deposição de elementos minerais nas copas, as quantidades de N, P e K retiradas do solo nas árvores com 40 anos é somente 8-45% das árvores com 10 anos. No caso do Mg, a transferência do solo para a árvore é mesmo inferior às entradas por precipitação atmosférica. Miller (1995) estende este modelo aos povoamentos florestais irregulares, argumentando que as fases sucessivas verificadas ao nível do povoamento deverão verificar-se igualmente na árvore individual, embora tendo em conta a composição específica e a estrutura do povoamento, assim como a posição relativa da árvore no povoamento.

2.2. O azoto nos ecossistemas florestais e nas árvores. O ciclo do azoto: processo chave para a produtividade nas florestas

O azoto (N) é um elemento essencial que constitui normalmente 0,5 a 5% do peso seco das plantas (Lewis, 1986; Santos, 1991; Marschner, 1995), sendo o quarto elemento mais abundante na composição dos tecidos vegetais, logo após o carbono, o hidrogénio e o oxigénio. É um constituinte primário das proteínas, ácidos nucleicos e clorofila, e portanto do protoplasma das células, quer vegetais, quer animais. As deficiências de N são consideradas a principal limitação para o crescimento das florestas (naturais ou artificiais), logo a seguir ao stress hídrico (Kozlowsky e Pallardy, 1997). No entanto, estas deficiências manifestam-se com maior intensidade nas plantas anuais, em que o crescimento se processa em poucas semanas, e portanto as necessidades de N aumentam em pouco tempo. As plantas perenes apresentam órgãos como as raízes ou os rizomas que desempenham funções de armazenamento, além da absorção de água e nutrientes. O seu padrão de crescimento permite que este se ajuste à disponibilidade imediata reduzida de nutrientes, devido à possibilidade de utilização de nutrientes armazenados nos órgãos perenes (Chapin, 1980). Nas árvores, o período anual de crescimento tende a ser mais alongado e a capacidade de armazenamento, aliada à mobilidade característica do N, no interior das plantas, diminuem muitas vezes os efeitos da indisponibilidade de N. Esta redistribuição do N, que está ligada à sua conservação nos tecidos das árvores, permite que estas cresçam em condições de disponibilidade reduzida de N no solo.

As florestas podem acumular durante o seu desenvolvimento grandes quantidades de N, encontrando-se este na sua maior parte em formas orgânicas (mais de 90%). As formas inorgânicas deste elemento, essenciais para o crescimento das florestas, constituem menos de 1% do total. Este contraste entre um grande capital de N acumulado e pequenas quantidades disponíveis para o crescimento é característico dos ecossistemas florestais. O crescimento das florestas depende da manutenção desta *pool* de N e da eficiência do seu uso. Esta depende dos "inputs" e da mineralização da matéria orgânica e do ciclo do N na biomassa florestal (Carlyle, 1986).

A figura 2.1 mostra os principais compartimentos e fluxos de azoto nos ecossistemas florestais.

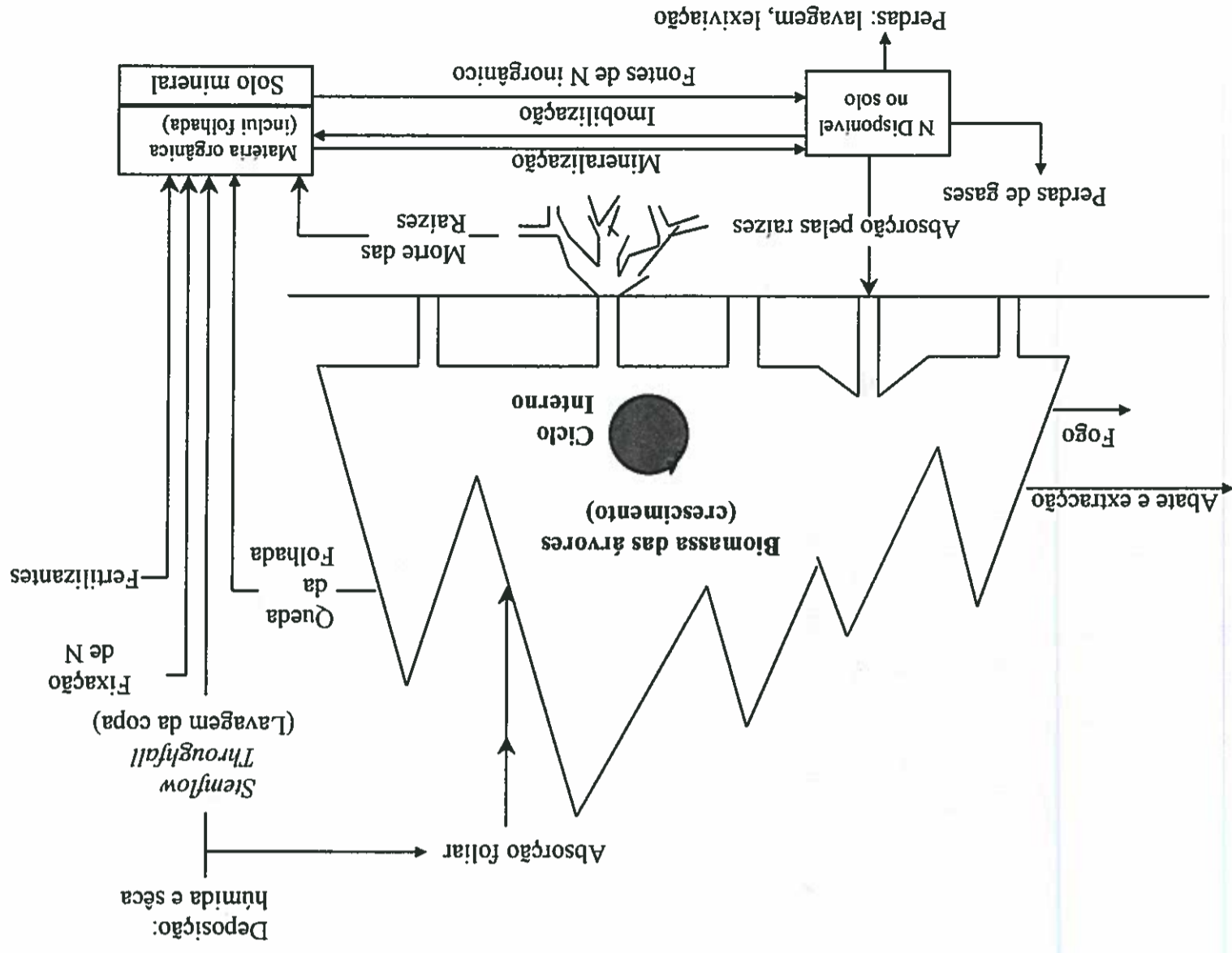


Figura 2.1. Ciclo do N nas florestas (adaptada de Carlyle, 1986)

2.2.1 Ciclo Geoquímico do N

2.2.1.1 Entradas

O azoto constitui cerca de 79% da atmosfera terrestre, constituindo esta o seu maior reservatório. No entanto a disponibilidade do azoto atmosférico para a maior parte dos seres vivos é reduzida. O azoto existe na atmosfera nas seguintes formas: azoto molecular (N_2), um gás inerte que necessita de uma quantidade alta de energia para quebrar a ligação N-N de forma a combinar-se com outros átomos; amónia (NH_3); iões nitrato (NO_3^-) ou amónio (NH_4^+). O azoto pode entrar nos ciclos biogeoquímicos em qualquer destas formas. A amónia pode ser absorvida pelas plantas directamente pelas folhas, podendo representar até 10% das suas necessidades. O nitrato e o amónio entram no ecossistema através de fenómenos de deposição atmosférica, húmida e seca (Garner, 1994), podendo nalguns casos representar adições apreciáveis de N (1 a 120 kg N ha⁻¹ ano⁻¹, segundo fontes citadas por Millard (1996); 10 a 70 kg N ha⁻¹ ano⁻¹, segundo Kimmins (1997); 2 a 40 kg N ha⁻¹ ano⁻¹, segundo Garner (1994); 4,2 kg N ha⁻¹ ano⁻¹, (Cortez, 1996, por defeito). Switzer e Nelson (1972), calcularam uma contribuição relativa do N da deposição atmosférica para o crescimento de um povoamento de *Pinus taeda* L. com 20 anos de 16%. Um aumento da deposição atmosférica de N tem sido verificado nas últimas décadas, sobretudo após a segunda guerra mundial, devido ao aumento das actividades humanas, particularmente a queima de combustíveis fósseis, pensando-se que estará na origem de aumentos da concentração de N nas folhas das árvores na Europa central (Hüttel e Schaaf, 1995).

A fixação biológica de N_2 por microorganismos representa a maior porção de N entrada na maioria dos ecossistemas (Lewis, 1986). Os organismos fixadores de N atmosférico podem ser simbióticos ou viver livremente. No primeiro grupo destaca-se o *Rhizobium*, que forma uma simbiose com Leguminosas, e o actinomiceta *Frankia*, que forma simbioses (nódulos) com amieiros (*Alnus* spp.) e casuarinas (*Casuarina* spp.) e ainda com o género *Myrica*. Kimmins (1997) cita estimativas de 200 kg N ha⁻¹ ano⁻¹ em culturas de leguminosas e 320 kg N ha⁻¹ ano⁻¹ em povoamentos de *Alnus*, e Parrotta et al. (1994) refere 82-94 kg N ha⁻¹ ano⁻¹ em povoamentos puros de *Casuarina equisetifolia*. No segundo grupo, destacam-se as cianobactérias autotróficas (*Nostoc*, *Anabaena*) e vários tipos de bactérias heterotróficas aeróbias (*Azotobacter*, *Azotococcus*,

povoamentos florestais, provavelmente devido a uma maior disponibilidade de nutrientes e água, consequência de uma ocupação do solo mais eficaz (Kimmins, 1997). A absorção de N na forma amoniacal pode ser favorecida por ectomicorrizas, nomeadamente em condições de menor disponibilidade de ião nitrato (por exemplo, maior acidez do solo) (Grove et al., 1996).

2.2.2.2 Assimilação do azoto e biossíntese de aminoácidos

As principais formas de N absorvidas pelas plantas são os iões nitrato (NO_3^-) e amónio (NH_4^+) (Santos, 1991). A maior parte do amónio absorvido é incorporado em formas orgânicas nas raízes, enquanto o nitrato possui grande mobilidade na planta, sendo translocado no xilema ou podendo ser armazenado nos vacúolos das células da raiz, parte aérea e órgãos de reserva, sem ser incorporado em compostos orgânicos (Marschner, 1995). No entanto, a assimilação do nitrato implica a sua redução a amónia (NH_3).

2.2.2.2.1 Redução do nitrato

O nitrato é rapidamente absorvido pelas árvores sendo, em condições normais, rapidamente reduzido, embora se possa verificar acumulação, quando a actividade metabólica é baixa. A redução do nitrato pode ser esquematizada pela equação (Marschner, 1995):



Esta reacção dá-se em dois passos: em primeiro lugar, o nitrato é reduzido a nitrito (NO_2^-) no citoplasma, pela enzima nitrato redutase, actuando a nicotinamida-adenina dinucleótido (NADH) ou a nicotinamida-adenina dinucleótido fosfato (NADPH) como dadores de electrões; o nitrito é seguidamente reduzido a amónio (NH_4^+) nos cloroplastos das folhas ou proplastídeos das raízes pela nitrito redutase, normalmente com a ferredoxina reduzida como dador de electrões (Kozlowsky e Pallardy, 1997). A energia para a redução dos nitratos é retirada da respiração ou de produtos das reacções luminosas da fotossíntese.

A redução do nitrato está estreitamente ligada à assimilação do carbono (Lawlor, 1994), mas pode ocorrer nas folhas ou nas raízes. No primeiro caso, os produtos da

assimilação são translocados para as raízes, locais de armazenamento e órgãos em crescimento. No segundo caso, os custos energéticos da redução são mais elevados (15 mol. de ATP para a redução de 1 mol de NO_3^- ; segundo Marschner, 1995) na medida em que os hidratos de carbono necessários têm de ser transportados no floema e oxidados nas raízes, podendo verificar-se fluxos de N nas formas não-reduzida e reduzida para tecidos em crescimento e locais de armazenamento (Lawlor, 1994). Parece pois que os custos do processo de assimilação do nitrato, considerados ao nível da planta, dependem fortemente da distribuição da assimilação por raízes e parte aérea (Gojon et al, 1994).

Verifica-se de uma forma geral que a redução dos nitratos ocorre nas folhas, sobretudo em plantas herbáceas com abundância de fertilizantes (Lewis, 1986). Com efeito, tanto a actividade da enzima nitrato redutase, nas raízes e na parte aérea, como a razão entre actividades da nitrato redutase da parte aérea e das raízes aumentam com o fornecimento de nitratos (Gojon et al, 1994). Nas plantas lenhosas, a redução do nitrato tende a ocorrer predominantemente nas raízes, uma vez que predominam formas orgânicas de N (aminoácidos e amidas) no translocado do xilema (Pate, 1980; Gojon et al, 1994). No entanto, Gebauer e Stadler (1990) e Stadler e Gebauer (1992) concluíram que a assimilação de nitratos se verificava predominantemente nas folhas de freixo (*Fraxinus excelsior*), ocorrendo variação sazonal provocada por alterações na disponibilidade de nitratos no solo e pela senescência das folhas. Verificou-se também que a actividade da nitrato redutase das raízes de coníferas excede largamente a das folhas (Gojon et al. 1994; Downs et al., 1993). A localização da redução de nitrato nas plantas é muito importante porque envolve custos energéticos ligados ao transporte e metabolismo dos ácidos carboxílicos envolvidos na síntese de aminoácidos. Quando a redução ocorre nas raízes, implica que uma quantidade apreciável de esqueletos de carbono tem de ser transportada das folhas para as raízes, uma vez que o NH_4^+ praticamente não é translocado, quer no xilema quer no floema. A localização da redução de nitratos nas plantas depende da disponibilidade de nitratos no solo e frequentemente das adaptações das diferentes espécies a outros factores ambientais, tais como a luz (reflectindo as disponibilidades de hidratos de carbono) e a temperatura (Kozlowsky e Pallardy, 1997). Para algumas espécies a proporção de nitratos reduzidos nas raízes aumenta com a temperatura e com a idade da planta (Marschner, 1995).

2.2.2.2.2 Assimilação do amónio

Como já foi salientado, enquanto o NO_3^- pode ser armazenado nos vacúolos sem provocar efeitos tóxicos, o NH_4^+ e sobretudo o NH_3 , são tóxicos, mesmo quando se encontram em baixas concentrações. A amónia produzida na redução do NO_3^- ou na fotorrespiração nas plantas C_3 e o NH_4^+ absorvido directamente pelas raízes combina-se com ácidos orgânicos para formar aminoácidos, amidas e compostos afins, evitando a toxicidade que poderia ocorrer por acumulação das formas reduzidas de N (Marschner, 1995).

A incorporação da amónia em aminoácidos envolve uma via metabólica cíclica envolvendo duas enzimas: a glutamina sintetase (GS) e a glutamato sintetase (GOGAT). Nas plantas estas enzimas foram identificadas em raízes e cloroplastos. A primeira reacção envolve a combinação de NH_4^+ , ácido glutâmico e consumo de ATP, produzindo glutamina. A GS tem uma forte afinidade com o NH_3 , sendo capaz de incorporá-lo se este se encontrar em baixas concentrações.

Para que a assimilação de NH_3 prossiga, verifica-se a reposição de ácido glutâmico a partir da glutamina e ácido oxaloglutárico, numa reacção envolvendo a GOGAT, que produz duas moléculas de ácido glutâmico por cada molécula de glutamina. Uma destas moléculas é utilizada na assimilação de NH_3 , sendo a outra utilizada na síntese de compostos azotados (Kozlowsky e Pallardy, 1997).

Também na assimilação de NH_3 se revela uma estreita ligação entre os metabolismos do carbono e do azoto ao nível da folha, nomeadamente nas plantas C_3 , na fotorrespiração, em que se dá a reassimilação da amónia (Leegood et al, 1995). A fotorrespiração ocorre porque a enzima ribulose 1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase (Rubisco) cataliza tanto a carboxilação como a oxigenação da ribulose -1,5- bifosfato (RuBP). Tanto o CO_2 como o O_2 competem entre si na actividade da Rubisco. Na reacção de oxigenação a RuBP divide-se, originando uma molécula de glicolato, desencadeando o "ciclo do glicolato". O glicolato é transferido dos cloroplastos para os peroxisomas em que o glicolato actua como aceitador de NH_3 , formando o aminoácido glicina. Após a translocação da glicina para as mitocôndrias, duas moléculas combinam-se para formar serina com libertação de CO_2 (daí o termo fotorrespiração). Também nesta reacção se liberta NH_3 .

Para que não ocorra toxicidade devida à acumulação de amónia ou perdas por volatilização, este composto é reassimilado pelo processo da formação de glutamina a partir do ácido glutâmico (Marschner, 1995; Leegood et al., 1995). Verifica-se pois um "ciclo fotorrespiratório do azoto". A fotorrespiração é uma importante via de síntese de aminoácidos nas células das folhas, em que o glicolato pode actuar como aceitador primário de NH_3 , produzido nos cloroplastos durante a redução de NO_3^- . A libertação de NH_3 durante a fotorrespiração é significativa, ocorrendo uma refixação pelas enzimas GS e GOGAT dez vezes superior à verificada na assimilação de NH_3 proveniente da redução de nitratos (Leegood et al., 1995).

2.2.2.2.3 Biossíntese de aminoácidos

As vias de produção de aminoácidos são várias e incluem a assimilação de amónia, resultando na produção de ácido glutâmico, principal veículo de introdução de N aminado no metabolismo das plantas, transaminação, transformação química de amidas ou de outros compostos azotados, e finalmente hidrólise das proteínas (Lewis, 1986; Kozlowsky e Pallardy, 1997). A síntese de aminoácidos pode ocorrer nas folhas ou em órgãos não-fotossintéticos. As fontes de energia e os esqueletos hidrocarbonados necessários à síntese de aminoácidos no primeiro caso são, respectivamente, a fotofosforilação e intermediários do ciclo de Calvin; no segundo caso, são a fosforilação oxidativa e intermediários do ciclo de Krebs (Lawlor, 1994). Em condições de deficiência de N (maior razão $\text{CO}_2/\text{NO}_3^-$), maiores fracções dos produtos das reacções luminosas e do transporte de electrões são consumidas na assimilação de CO_2 , e tendem a acumular-se mais hidratos de carbono (por exemplo, amido). Quando o N não limita tanto o crescimento (menor razão $\text{CO}_2/\text{NO}_3^-$), tendem a acumular-se aminoácidos (McDonald e Davies, 1996).

O azoto orgânico dos grupos amina do ácido glutâmico e da glutamina pode ser utilizado na síntese de outras amidas, aminoácidos, ou mesmo proteínas, através de transferência de grupos amina de aminoácidos para outros esqueletos carbonados (reacções de transaminação). Estas reacções são catalizadas por enzimas designadas transaminases (Marschner, 1995).

2.2.2.3 Distribuição do azoto nas árvores

A distribuição relativa do azoto nas árvores varia com as espécies e com as características climáticas e edáficas da floresta. Esta distribuição depende da distribuição da biomassa e da concentração de N nos vários tecidos (van den Driessche, 1984). As maiores concentrações de N encontram-se tipicamente em tecidos compostos por células fisiologicamente activas, como nas folhas e tecidos meristemáticos como o câmbio e extremidades de caules e de raízes (Kozlowsky e Pallardy, 1997).

Também a idade das árvores determina mudanças na distribuição de N, sobretudo porque a partição da biomassa se altera. As árvores mais novas possuem uma parte importante da sua biomassa nas folhas mas a proporção da biomassa correspondente ao tronco e casca aumenta progressivamente com a idade das árvores. Consequentemente, a proporção de N presente nas folhas torna-se cada vez menos importante, e a proporção de N presente no tronco e casca, mais importante (Miller, 1984; van den Driessche, 1984; Kimmins, 1997).

O envelhecimento dos tecidos é também acompanhado por uma diminuição das concentrações de N, tanto nas folhas como nos tecidos lenhosos (Kozlowsky e Pallardy, 1997). Esta diminuição da concentração pode ocorrer por um efeito de aumento do peso seco (p.ex. aumento da importância das paredes celulares) para a mesma quantidade de N, ou por um efeito de perda efectiva de N, quer esteja associada à senescência sazonal, quer simplesmente à idade e posição das folhas na copa (Kimmins, 1997). A luz desempenha também um papel importante na concentração de N nas copas das árvores. À medida que a copa se desenvolve estabelece-se um gradiente de luz, em que as folhas da periferia da copa estão mais iluminadas e as do seu interior, ensombradas. Assim, para uma determinada quantidade de N presente na copa, a capacidade fotossintética da copa dependerá da distribuição do N pelas folhas que a constituem. Observaram-se gradientes de concentração foliar de N dependentes da iluminação das folhas em copas de *Prunus persica* (DeJong e Doyle, 1985), *Solidago altissima* (Hirose e Werger, 1987), *Piper* (Walters e Field, 1987), *Nothofagus solandri* (Hollinger, 1989), *Eucalyptus grandis* (Leuning et al. 1991a), *Eucalyptus globulus* (Pereira et al. 1992), *Juglans regia* (Weinbaum et al. 1994), *Acer saccharum* (Niinemets e Tehunen, 1997), *Populus tremula*, *Tilia cordata* e *Corylus avellana* (Kull e Niinemets, 1998), em que as folhas ensombradas possuem menor concentração de N do que as folhas iluminadas, sugerindo

uma resposta à distribuição espacial da luz (Field e Mooney, 1986). Os efeitos combinados da luz e da frutificação na redistribuição de N na copa de nogueiras foram comprovados por Weinbaum et al (1994). Estes autores demonstraram que a remobilização de N a partir das folhas representou 28% e 44% da acumulação de N nos frutos, respectivamente em folhas ensombradas e bem iluminadas, e desempenha um papel relevante na frutificação. A proximidade às zonas iluminadas da copa, cujas folhas possuem maiores concentrações de N, parece determinar o número de frutos formados, sendo este inferior nas zonas ensombradas da copa. Por outro lado, a presença de frutos em desenvolvimento nestas zonas acentua as cloroses e antecipa a senescência das folhas (Klein et al., 1991).

2.2.2.4 Perdas de N pelas árvores

Estão incluídos nesta categoria as transferências verificadas nos ecossistemas florestais pelos processos de lavagem e lixiviação das copas, desfolha por herbívoros, perdas associadas à reprodução e queda de folhada (Kimmins, 1997).

Pode definir-se a lixiviação como a remoção de solutos orgânicos e inorgânicos directamente das partes aéreas das plantas pela acção da água da chuva, regas, orvalho, neblinas e nevoeiros. Os mecanismos associados à lixiviação podem diferir de acordo com a origem dos solutos. Marschner (1995) identifica quatro categorias: (a) solutos excretados activamente para as superfícies externas das plantas (por exemplo, excreções de sais ou ácidos orgânicos); (b) excreção de solutos inorgânicos nas pontas e margens das folhas; (c) lixiviação a partir de zonas danificadas das folhas, por acção do vento ou de desfoliadores, ou (d) solutos lixiviados a partir do apoplasto dos tecidos intactos das folhas. Embora quantidades consideráveis de formas inorgânicas sejam lixiviadas, a maior parte cabe a formas orgânicas (Tukey, 1970).

A lixiviação pode representar cerca de 15% do N transferido das copas para o solo (Chapin, 1991). Aumenta de uma forma geral com a idade das folhas, embora as folhas muito novas em rápida expansão possuam quantidades significativas de N em formas muito móveis, propiciando condições favoráveis à sua ocorrência. Quando ocorre a senescência a permeabilidade das membranas aumenta e aumenta a concentração de solutos orgânicos e inorgânicos no apoplasto das folhas, favorecendo a lixiviação. Também as características da precipitação determinam a quantidade lixiviada, tais como

contribuição para a restituição de N ao solo, pelo que grande parte dos valores são estimativas por defeito do fluxo total de N para o solo da floresta. As raízes finas podem constituir 8 a 67% da produtividade primária líquida de uma floresta, sendo a percentagem maior em solos menos férteis (Kimmins, 1997).

2.2.2.5 Decomposição da folhada: mineralização do N

A decomposição da folhada é muitas vezes o passo crítico do ciclo biogeoquímico das florestas, e é a partir dela que fundamentalmente se dá a reposição das formas inorgânicas de N que são absorvidas pelas árvores (Carlyle, 1986). Se a decomposição for lenta, a imobilização dos nutrientes no solo prolongar-se-á por períodos longos e tanto o ciclo de nutrientes como a produtividade das florestas sofrerão uma redução. A decomposição da folhada nas florestas temperadas de folhosas é de uma forma geral rápida (1-3 anos para a decomposição das folhas) mas lenta nas florestas de coníferas boreais (4-30 anos para a decomposição das agulhas) (Kimmins, 1997). Switzer e Nelson (1972), calcularam que este processo fornecia cerca de 40% das necessidades de N numa plantação de *Pinus taeda* L. com 20 anos.

O processo de decomposição é a transformação biológica de um substrato orgânico. Neste processo, a actividade microbiana é suportada pelo substrato. A mineralização do N é a libertação de N da matéria orgânica e a sua conversão em formas inorgânicas assimiláveis, como nitrato e amónio. Trata-se de um processo aeróbico constituído por várias fases: aminização (decomposição das formas orgânicas do azoto em compostos azotados mais simples, nomeadamente aminas e aminoácidos); amonificação (transformação dos compostos resultantes da aminização em compostos amoniacaís) e nitrificação (oxidação do azoto amoniacal em azoto nítrico). A regulação da decomposição e portanto, da libertação de nutrientes depende da qualidade da folhada (nomeadamente da sua razão C/N), dos organismos do solo e de factores ambientais como a temperatura, humidade do solo, arejamento, pH, disponibilidade de nutrientes (Carlyle, 1986). O resultado líquido da mineralização representa sempre a diferença entre a mineralização total e a imobilização pelos microorganismos do solo, que utilizam o N no crescimento e multiplicação.

a duração e intensidade da precipitação, o intervalo entre chuvas e a própria composição química da água da chuva. A taxa de lexiviação é superior no início das chuvas, decaindo de seguida exponencialmente durante a duração das mesmas (Tukey, 1970). A frequência das chuvas é pois mais importante na determinação da quantidade de nutrientes lexiviados do que a sua intensidade. As chuvas ácidas também aumentam a lexiviação de catiões, aumentando os fenómenos de troca iónica e alterando as características químicas da cutícula das folhas, aumentando a sua susceptibilidade à difusão e fluxos de nutrientes a partir da superfície das folhas (Morrison, 1984; Riederer, 1989; Klemm, 1989). Kimmins (1997), citando vários autores, aponta uma remoção de N das copas pela precipitação atmosférica de 0-12 kg ha⁻¹ ano⁻¹. As contribuições relativas do gotejamento das copas e do escurrimto ao longo do tronco também variam com a morfologia do tronco e das copas. Por exemplo, Cortez (1996) encontrou valores totais de cerca de 9 kg ha⁻¹ ano⁻¹ e de 3,6 kg ha⁻¹ ano⁻¹, respectivamente em pinhal (60 anos) e eucaliptal (7 anos), mas com índices de cobertura do solo semelhantes. Destes valores somente 2-10% do N tinha sido removido por escurrimto ao longo do tronco.

O processo de lexiviação e lavagem das superfícies das árvores pode ser importante, na medida em que disponibiliza nutrientes facilmente utilizáveis pelas plantas e podem contribuir para a nutrição das árvores crescendo em solos pobres em nutrientes. Switzer e Nelson (1972), calcularam que este processo fornecia cerca de 5% das necessidades de N numa plantação de *Pinus Taeda* L. com 20 anos.

A queda de folhada é provavelmente a principal via de transferência de N ao solo (Kimmins, 1997). As quantidades que atingem o solo dependem da quantidade de folhas e outras partes das árvores que caem, cujas características, nomeadamente a composição química, foram alteradas pelo processo de senescência, associado ao ciclo interno. As quantidades de N transferidas para o solo são muito variáveis (entre 11 e 199,5 kg ha⁻¹ ano⁻¹). Estas quantidades são maiores em condições que favoreçam o crescimento das árvores e em que se verifiquem produtividades altas (Carlyle, 1986). Num ensaio com *Eucalyptus globulus*, em que se testou a influência do fornecimento de água e nutrientes sobre a produtividade primária, as quantidades de N transferidas para o solo variaram entre 168 kg ha⁻¹ ano⁻¹ nas parcelas fertilizadas e regadas e 76 kg ha⁻¹ ano⁻¹ nas parcelas que só receberam água da chuva (Madeira et al., 1995). A queda de folhada não inclui normalmente a mortalidade das raízes finas, que deverá constituir uma importante

2.3. Ciclo interno do azoto nas árvores.

Do que ficou escrito, pode concluir-se que as principais fontes de azoto para as árvores são: (a) a mineralização da matéria orgânica do solo, (b) a lavagem e leixiviação das superfícies das copas, (c) a deposição atmosférica, (d) os fertilizantes, se aplicados (e) nalguns casos, a fixação do azoto atmosférico e, *last but not least*, o ciclo interno do N (ciclo "bioquímico", na terminologia de Switzer e Nelson, 1972). O fenómeno da retranslocação do N tem sido tradicionalmente mais estudado no que diz respeito à transferência deste nutriente das folhas senescentes para os ramos e tronco das árvores, comparando as concentrações de N antes e depois da queda das folhas. Os valores percentuais do N retranslocado nessas condições encontrados numa grande quantidade de estudos variam entre 5 e 80% do N existente inicialmente nas folhas (Kimmins, 1997). O valor mais baixo (5%) corresponde ao género *Alnus*. A retranslocação de N a partir das folhas senescentes de árvores de folha caduca varia entre 1/4 e 2/3 da concentração (Kozlowsky e Pallardy, 1997). Borman e Likens (1979) verificaram uma reutilização interna anual de 33% numa floresta de folhosas de folha caduca na Nova Inglaterra. Escudero et al. (1992), trabalhando com 21 espécies florestais da Península Ibérica, incluindo perenifolias e caducifolias, na metade norte da meseta castelhana, determinaram percentagens de retranslocação variando entre 24% e 69%. Em espécies florestais de crescimento rápido, Fife e Nambiar (1997) verificaram 36-49% de N retranslocado aquando da senescência das agulhas em plantações de *Pinus radiata* na Austrália e Pereira et al. (1989) determinaram valores de 60% de N retranslocado, independentemente da fertilidade ou condições hídricas do solo, em plantações de *Eucalyptus globulus* com 2 anos em Portugal. Cortez (1996) estimou esta contribuição entre 25% e 50%, segundo o método utilizado no cálculo, trabalhando em povoamentos de *Eucalyptus globulus* com 7 anos, em Portugal.

Uma parte importante das necessidades de N das árvores podem ser satisfeitas pelo ciclo interno. Miller (1995), apresenta uma lista de resultados referentes a contribuições da retranslocação de N antes da queda de folhada de cerca de 39% das necessidades de N em povoamentos de *Pinus taeda* L. com 20 anos (Switzer e Nelson, 1972); 50% em povoamentos de *Pinus nigra* com 40 anos (Miller, 1986); 55% em povoamentos de *Pinus sylvestris* com 46 anos (Lim e Cousins, 1986); 54% em povoamentos de *Abies amabilis* com 175 anos (Turner e Singer, 1976); 54% em

povoamentos mistos de caducifolias (Pastor e Beckheim, 1984) e 79% em povoamentos mistos de carvalhos na América do Norte (Brown, 1974).

Outros estudos feitos com árvores de folha persistente mostraram que a retranslocação de N ocorre a partir de folhas de todas as idades, independentemente do fenómeno da senescência (Fife e Nambiar, 1982, 1984; 1997; Nambiar e Fife, 1987, 1991; Millard e Proe, 1993; Proe e Millard, 1994). Especialmente em coníferas, a retranslocação de N parece ser motivada pelo desenvolvimento rápido de tecidos em crescimento, como as folhas e ramos novos, que são os locais de destino do N retranslocado (Nambiar e Fife, 1991). Em árvores novas de *Pinus radiata*, 48% do N necessário à produção de folhas novas pode ter origem em folhas somente com 1 ano (Fife e Nambiar, 1982).

As árvores absorvem e armazenam N nas épocas do ano de maior disponibilidade deste nutriente. A redistribuição interna do N nas árvores constitui um mecanismo importante de conservação do N, que poderá ficar disponível para uma utilização posterior, sobretudo em condições de menor disponibilidade de N no solo ou de aumento das taxas de crescimento (Nambiar e Fife, 1987). A dinâmica do N nas copas pode contribuir para aumentar a eficiência da utilização do N em relação à assimilação do carbono, considerando a copa no seu todo (Field e Mooney, 1986). A conservação do N nos elementos da copa pode ser a razão para que o estímulo de crescimento motivado pela aplicação de fertilizantes azotados persista vários anos após a aplicação, dependendo a eficiência de utilização do N do fertilizante do da contribuição do ciclo interno para a nutrição das árvores (Fife e Nambiar, 1997).

A contribuição do ciclo interno para o crescimento das árvores tende a aumentar à medida que estas crescem, sendo este efeito acentuado assim que o copado completa o seu desenvolvimento. Assim, Miller (1984) calculou que o N retranslocado representa 50% do total necessário anualmente para o crescimento de um povoamento de *Pinus nigra* com altura média de 11 m (40 anos), mas somente 16% num povoamento da mesma espécie com altura média de 2 m (10 anos). A retranslocação interna de N pode ser menos importante em árvores novas, de pequenas dimensões, cujo capital interno de N é pequeno em relação às necessidades para o crescimento. No entanto, ela verifica-se nas árvores de todas as idades, ligada ou não à senescência. Nambiar e Fife (1991), salientam que as variáveis chave que determinam as quantidades e taxas de retranslocação de N nas coníferas são o crescimento e as taxas de absorção e assimilação

de N. Assim, os factores ambientais que promovem o crescimento promovem de igual modo a retranslocação de N. Estudando a resposta da retranslocação à fertilização e rega em agulhas de *Pinus radiata*, Crane e Banks (1992) observaram uma correlação estreita entre retranslocação e crescimento somente quando os povoamentos eram regados. Estudos mais recentes indicam que a regulação da retranslocação nas coníferas depende da combinação do crescimento (das *sinks* formadas), da disponibilidade de N no solo e das características ecológicas de cada espécie (Munson et al., 1995; Hawkins et al., 1998, 1999).

Nas árvores de folha caduca, o ciclo interno de N é constituído pelos fenómenos de retranslocação de N a partir das folhas senescentes e muito provavelmente das raízes (Ferrier e Alexander, 1991) e também pela remobilização de N a partir dos tecidos lenhosos perenes, que são neste caso os locais de armazenamento de N no Inverno, para o crescimento na Primavera. Nas árvores de folha persistente, nomeadamente as coníferas, verifica-se uma componente adicional de retranslocação de N a partir das folhas mais antigas, na direcção das zonas apicais de crescimento, durante períodos de crescimento mais intenso, garantindo assim, o fornecimento de N a essas zonas (figura 2.2 e figura 2.3). O ciclo interno de N nas árvores compreende assim, dois processos distintos: o *armazenamento* de N nos seus tecidos e a *remobilização* de N a partir dos locais de armazenamento, para os tecidos em crescimento (Millard, 1993, 1995, 1996).

2.3.1 Armazenamento de N

A capacidade de armazenar N é uma característica da maior parte das plantas. Sendo plantas perenes, as árvores apresentam diferenças na composição (concentração) de N dos seus tecidos que condicionam, em conjunto com a distribuição do N pelos diversos órgãos, o padrão de armazenamento de N. Pate (1983) definiu armazenamento de N como "acumulação de N em quantidades que excedem manifestamente as necessidades imediatas do crescimento e manutenção dos tecidos". Chapin e Shaver (1988) caracterizaram produtos envolvidos no armazenamento segundo a dinâmica observada nos tecidos, decrescendo em períodos de crescimento rápido e aumentando, quando a assimilação excede as necessidades. Millard (1988) considera a condição de armazenamento como aquela em que o N pode ser mobilizado a partir de um tecido e subsequentemente reutilizado para o crescimento ou manutenção de outro tecido. Assim,

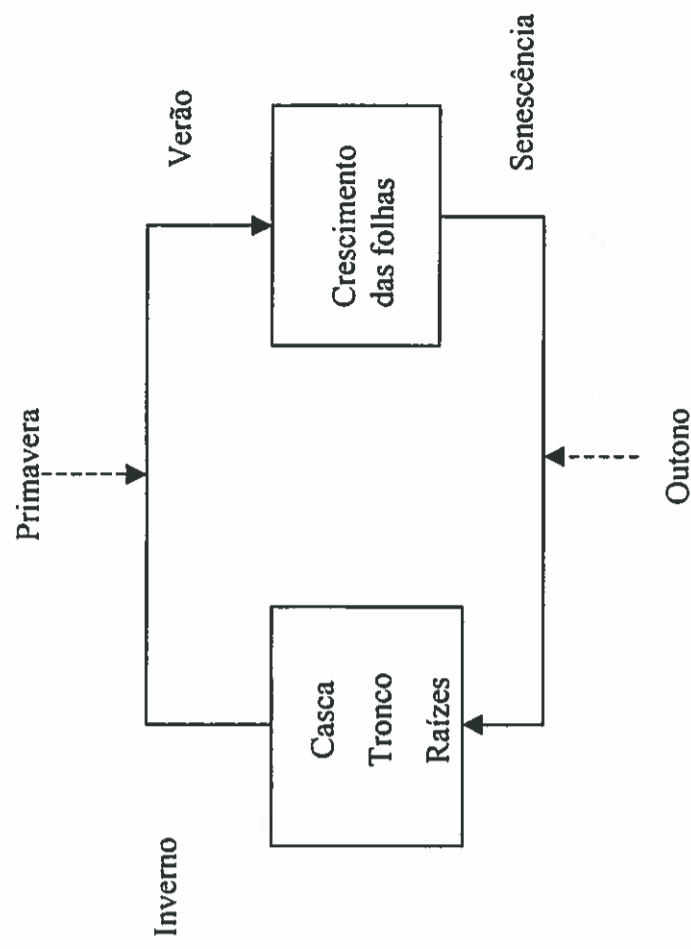


Figura 2.2. Padrão sazonal de remobilização de N numa árvore de folha caduca. (---) absorção; (—) remobilização (Adaptada de Millard, 1996)

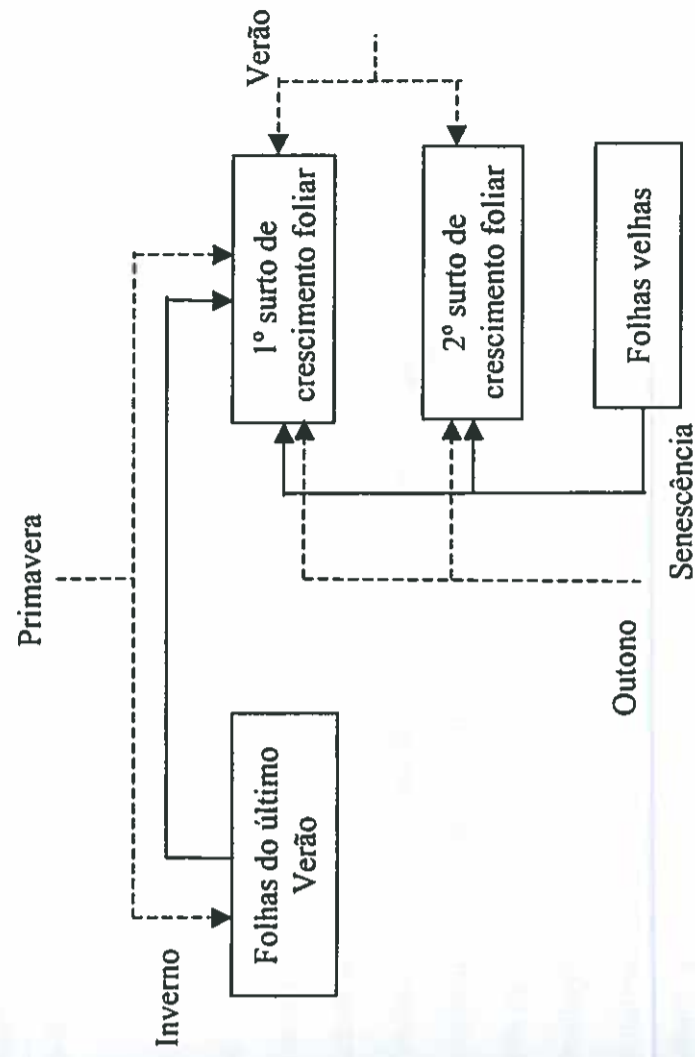


Figura 2.3. Padrão sazonal de remobilização de N numa árvore de folha persistente (---) absorção; (—) remobilização (Adaptada de Millard, 1996)

este autor distingue entre acumulação, que ocorre quando a oferta de N excede a procura para crescimento e manutenção, e armazenamento, que implica o uso potencial do N mobilizado de um tecido para o crescimento e manutenção de outros tecidos.

A acumulação só ocorre quando não existe limitação do crescimento pelo N e armazenamento pode sempre ocorrer, *mesmo em condições de limitação de N*. É este atributo (mobilização e utilização de N armazenado) que permite desfasar o crescimento das folhas da absorção de N pelas raízes, e lhe confere significado ecológico. Nas condições das regiões temperadas, em que o período vegetativo tem um início bem marcado e o crescimento das folhas se dá em muitos casos em poucas semanas, uma parte importante do N necessário a este crescimento provém da remobilização de N armazenado nas árvores. Numa floresta de folhosas na América do Norte (Tennessee) a remobilização de reservas para as folhas estava completa antes do fim de Maio, no entanto a absorção de N pelas raízes só atingiu o máximo em Junho (Luxmore et al., 1981). Nas regiões mediterrânicas e tropicais, em que se verifica uma sazonalidade marcada, com a estação seca a determinar menor disponibilidade de água e nutrientes, mas com condições de luz e temperatura favoráveis, o armazenamento de N pode desempenhar um papel importante no crescimento das árvores (Schmidt e Stewart, 1998).

Como a acumulação também pode suportar crescimento no futuro, Chapin et. al. (1990) definiram *armazenamento* como “acumulação de recursos nas plantas que podem ser mobilizados no futuro para a biossíntese”, distinguindo três classes de armazenamento: *acumulação* (“consumo de luxo”), que pode ocorrer quando o fornecimento de N é superior à capacidade de utilização de N para o crescimento (“necessidades”); *formação de reservas*, que envolve a compartimentação de N regulada metabolicamente, através da síntese de compostos, competindo com o crescimento ou com os mecanismos de defesa da planta; e *reciclagem*, que envolve a transformação e circulação interna de compostos previamente utilizados no crescimento ou defesa, permitindo a reutilização futura de N no crescimento (por exemplo, na senescência das folhas). Heilmeyer e Monson (1994), desenvolveram esta categorização, designando a acumulação como “deposição interina”. Estes autores individualizaram as flutuações diurnas de nitratos nos vacúolos ou de amido nos cloroplastos, bem como a dualidade da Rubisco como proteína fotossintética essencial (ver abaixo) e como forma de armazenamento de N, como classes de armazenamento com características próprias.

Estas definições destacam a natureza dinâmica do armazenamento e sublinham que a capacidade de armazenamento de N não depende do estado nutricional da planta, embora este condicione obviamente a quantidade armazenada de N (Millard, 1996).

O N pode ser armazenado nas raízes, caule e folhas das árvores. As árvores podem armazenar N durante o Inverno e durante o Verão, dependendo em grande parte da demografia foliar. As alterações sazonais da concentração de N das folhas e tecidos lenhosos das árvores reflectem a dinâmica associada ao armazenamento e reciclagem de N. Tanto nas árvores de folha caduca como nas de folha persistente, a concentração de N nos tecidos lenhosos tende a aumentar durante o Outono e Inverno, a diminuir quando o crescimento é retomado na Primavera, e a aumentar posteriormente, à medida que o crescimento abandona e cessa (Kozlowsky e Pallardy, 1997).

O N pode ser armazenado nos tecidos vegetais sob a forma inorgânica (nitrate), aminoácidos livres e proteínas (Millard, 1988). As árvores armazenam N nos tecidos lenhosos durante o Inverno, sobretudo na casca dos ramos e do tronco. No Outono dá-se a hidrólise das proteínas nas folhas senescentes das árvores de folha caduca. Os aminoácidos resultantes são translocados no floema para os locais de armazenamento de N. Proteínas de armazenamento foram detectadas como as principais reservas temporárias de N durante o Inverno, em várias espécies arbóreas caducifólias e perenifólias (Tromp, 1970; Wetzel et al., 1989; Langheinnich e Tischner, 1991; Näsholm e Ericsson, 1990; Sauter e Van Cleeve, 1990; Harms e Sauter, 1994). Estas proteínas específicas foram isoladas na casca e nas células parenquimatosas do xilema, e são sintetizadas no Outono e hidrolizadas na Primavera, durante o crescimento da parte aérea. No Inverno, as proteínas estão localizadas em "corpos proteicos" em vacúolos, dispersos no citoplasma. No Verão, não se verifica a presença desses "corpos" (Wetzel et al., 1989). As proteínas de reserva foram identificadas em faia, freixo, bétula, carvalho, choupo, salgueiro e ácer (Kozlowsky e Pallardy, 1997). Stepien et al., (1994) apresenta uma lista de espécies e respectivos trabalhos desenvolvidos com árvores de folha caduca. Também nas espécies de folha persistente, nomeadamente coníferas, foram detectadas proteínas de armazenamento (Wetzel e Greenwood, 1989, em casca de *Larix decidua* e *Pinus strobus*, Harms e Sauter, 1991, no lenho de *Taxodium distichum* e *Metasequoia*, Roberts et al., 1991, em gomos de *Pseudotsuga menziesii* e gomos, caules e raízes de *Picea*). Embora estas proteínas sejam ricas em arginina e em outras amidas (Millard e Proe, 1991) não parece existir uma relação directa entre os compostos

translocados e a composição da proteína em aminoácidos. Parece sim que após a hidrólise, os aminoácidos libertados sofrem várias transformações químicas que resultam na síntese de glutamina, arginina ou amidas antes do transporte no xilema (Clausen e Apel, 1991; Sauter e van Cleeve, 1992; Schneider et al., 1996).

A natureza e padrão de acumulação destas proteínas foram estudados sobretudo em choupos (*Populus deltoides*). No final do Verão, verifica-se uma acumulação do RNA mensageiro (mRNA) que codifica a proteína de reserva e a proteína de peso molecular 32000 (Clausen e Apel, 1991; Coleman et al., 1991, 1992). Nos choupos, a proteína é rica em serina, leucina, fenilalanina e lisina. A sua síntese parece ser desencadeada por fotoperíodos curtos (talvez resposta mediada por fitocromo) (Coleman, et al. 1992, 1993) e aumento da disponibilidade de N, através da fertilização com nitrato de amónio, mesmo em dias longos (Coleman et al, 1994). Este último facto sugere que a proteína pode desempenhar um papel tanto no armazenamento sazonal de N como durante períodos de excesso de N, tal como acontece aquando da senescência. A deposição da proteína em raminhos de *Populus canadensis* foi induzida durante o Verão, através da criação de um excesso de assimilados através de desfolha e de incisão anelar dos raminhos (Sauter e Neumann, 1994), evidenciando uma interacção entre metabolismo do N e do carbono. Os longos fotoperíodos, a quebra da dormência e a presença dos gomos intactos parecem ser essenciais para o início da degradação da proteína 32000 de reserva nos choupos (Coleman et al, 1993). Este último facto sugere que os gomos em expansão de alguma forma emitem um sinal regulador da degradação ao local de armazenamento da proteína.

As raízes das árvores novas também podem armazenar N durante o Inverno (Taylor e May, 1967, cit. por van den Driessche, 1984; Tromp, 1983). Aminoácidos livres (principalmente arginina) foram detectados como formas de armazenamento nas raízes de amoreiras (Tromp, 1983), enquanto em *Acer pseudoplatanus* (Millard e Proe, 1991) e em *Pinus sylvestris* (Näsholm e Ericsson, 1990) o N é armazenado durante o Inverno em proteínas ricas em arginina. As árvores reciclam N durante a senescência das raízes, podendo este N ser aproveitado para o crescimento das novas raízes (Ferrier e Alexander, 1991). Embora a importância do armazenamento sazonal de N nas raízes de árvores de grandes dimensões não tenha sido determinada, van den Driessche (1984) refere a necessária importância do N da toia e das raízes nas talhadas.

As árvores de folha persistente armazenam N nas suas folhas durante o Inverno (Nambiar e Fife, 1991; Helmisaari, 1992). A maior parte do N das folhas é incorporado em proteínas, das quais a mais abundante é a Rubisco (nas plantas C₃) (Millard, 1988; Evans, 1989). Esta enzima tem sido sugerida como a principal forma de armazenamento de N tanto em plantas anuais (Millard e Catt, 1988; Millard, 1988) como em árvores (Millard e Thomson, 1989). Tanto a proteína solúvel total como a actividade da Rubisco baixaram em folhas mais velhas de *Pinus sylvestris* durante o crescimento das folhas (Gezelius e Hallén, 1980; Gezelius et al., 1981), sugerindo que a Rubisco pode desempenhar um papel de proteína de armazenamento de N durante o período de expansão das copas. Camm (1993) atribuiu à Rubisco e também, em certa medida, às proteínas ligadas à clorofila um papel de armazenamento de N em *Pseudotsuga menziesii*. Em algumas árvores de folha caduca, a principal fonte de N que é remobilizado a partir das folhas é a Rubisco. Em *Malus domestica*, a Rubisco é responsável por mais de 90% da proteína solúvel perdida das folhas durante a senescência (Kang e Titus, 1980) e contribui entre 32-48% do N remobilizado para suportar o crescimento das folhas no ano seguinte (Millard e Thomson, 1989). Por outro lado, Quick et al. (1991), trabalhando com plantas mutantes de *Nicotiana tabacum* contendo diferentes teores de Rubisco, verificou que em plantas que continham somente 60% da Rubisco das variedades selvagens, praticamente não havia inibição da fotossíntese, devido a uma compensação por aumento da actividade da enzima, depreendendo-se que as quantidades daquela proteína normalmente presentes nas plantas são superiores às necessárias para a fotossíntese. O N armazenado nas folhas das árvores pode possuir dois níveis de disponibilidade, ou de mobilidade potencial (Miller et al, 1979; Millard e Thomson, 1989; van den Driessche, 1991). O primeiro nível representa a aquisição de N recente pelas raízes ou pelas folhas e inclui o armazenamento sazonal temporário, como o N da Rubisco e a remobilização outonal nas caducifólias. O segundo nível, sugerido por Miller et al. (1979), estudando uma conífera (*Pinus nigra*), representa as formas de N potencialmente mobilizáveis para suprir um fornecimento inadequado a partir do N armazenado no primeiro nível, muitas vezes remobilizadas em condições de disponibilidade de N relativamente baixas, causando a morte de tecidos mais velhos. A medida que a árvore cresce e a copa se expande o armazenamento de primeiro nível aumenta devido ao aumento da biomassa de folhas e raízes, sobretudo no Verão, é provável que o ciclo interno de N contribua de forma crescente para as necessidades

sazonais de crescimento. Hawkins e Henry (1999) postulam, com base nos resultados apresentados, que quando o fornecimento de nutrientes é adequado, a existência de uma copa desenvolvida aumenta o contributo da retranslocação para o crescimento. No entanto a retranslocação pode ser induzida por um decréscimo súbito na disponibilidade de nutrientes.

Millard (1988) discute os custos energéticos do armazenamento do N e salienta que aqueles são mais elevados na forma de proteínas do que na forma de nitrato, devido aos processos metabólicos envolvidos. No entanto, o armazenamento de N pelas plantas dá-se preferencialmente na forma de compostos orgânicos. As vantagens apontadas são (1) maximização do potencial para a assimilação do carbono, (2) minimização de problemas de regulação osmótica nas folhas, e (3) optimização das condições para a remobilização de N das folhas mais velhas, ensombradas, desde que o N esteja armazenado na forma orgânica (Millard, 1988).

2.3.2 Remobilização de N

O N é remobilizado a partir dos locais de armazenamento durante períodos de crescimento (Primavera) e senescência das folhas (Outono) (Helmisaari, 1992; Millard, 1996; Fife e Nambiar, 1997).

O principal local de armazenamento de N durante o Outono e Inverno nas coníferas de folha persistente é a classe mais nova de folhas (Fife e Nambiar, 1984; Millard e Proe, 1993; Munson et al. 1995). Como as folhas podem durar vários anos, a remobilização de N ocorre frequentemente sem senescência, nos períodos de crescimento activo das folhas (Fife e Nambiar, 1991). O padrão da remobilização depende dos ritmos de crescimento e fenologia das espécies. Por exemplo, Nambiar e Fife (1987), estudando o *Pinus radiata*, que apresenta vários surtos de crescimento anualmente, notaram um decréscimo do teor de N das agulhas do ano mais temporã, devido à remobilização de N para as agulhas que surgem mais tarde no mesmo ano. Leuning et al. (1991) também observou retranslocação de N das folhas velhas para as folhas novas numa folhosa de folha persistente como o *Eucalyptus grandis* e corroborou a hipótese de maximização da assimilação de carbono através da distribuição de N na copa de forma a manter as concentrações de N mais elevadas nas folhas directamente expostas à radiação solar. Uma distribuição semelhante de N nas copas foi demonstrada

em folhosas de folha caduca (De Jong et al., 1989). Embora nem todas as árvores de folha persistente remobilizem N sem ocorrer senescência (Jonasson, 1989) é muito possível que estudos de balanços de nutrientes que baseiam a estimativa do ciclo interno do N na diferença entre o seu teor em folhas verdes e folhas senescentes tenham substituído a contribuição do ciclo interno do N para o crescimento anual das árvores (Millard, 1993).

Millard (1996) destaca a questão de saber se a remobilização de N na Primavera nas coníferas é condicionada pelo fornecimento de N ou pelas necessidades de N provocadas pelo crescimento anual da parte aérea. Parece certo que o fornecimento de N para uma conífera afectará tanto a absorção daquele nutriente como a quantidade armazenada, determinando o potencial de remobilização (Millard e Proe, 1993). No entanto, o estado nutricional da árvore no Outono, no que diz respeito ao N, pode determinar o crescimento do ano seguinte através da formação de um maior número de gomos no Outono nas árvores que receberam mais N, condicionando as necessidades de N do ano seguinte (Millard e Proe, 1993).

As árvores de folha caduca mostram maior sazonalidade no padrão de remobilização de N do que as árvores de folha persistente. Podem definir-se dois períodos característicos de remobilização, na Primavera, durante a expansão dos gomos e crescimento das folhas, e no Outono, durante a senescência das folhas. Embora alguns factores implicados na remobilização primaveril tenham já sido detectados (ver acima), a regulação dos fenómenos de reciclagem de N durante a senescência das folhas ainda é pouco compreendida. Esta regulação é muito importante porque as folhas podem conter mais de 40 % do total de N de uma árvore (Kozlowsky e Pallardy, 1997) e a perda da totalidade do N das folhas ocasionaria a perda, pelo menos temporária, de uma fracção importante deste nutriente através da queda das folhas. Uma parte considerável do N das folhas é retranslocada para os ramos e tronco das árvores (0 a 79%, segundo Chapin e Kedrowsky, 1983) (ver acima). No entanto, estudos baseados na quantificação da remoção de N através da variação da concentração de N provavelmente substituíram a remobilização de N. Com efeito, durante a senescência das folhas verifica-se uma considerável perda de carbono simultaneamente com a perda de N, sendo fundamental determinar a variação de peso das folhas senescentes, juntamente com a concentração de N. No entanto, Fife e Nambiar (1997) apresentaram resultados da variação do peso seco

das folhas, concluindo que os valores da retranslocação encontrados eram independentes do peso das folhas.

As folhas das árvores e outras plantas lenhosas tombam periodicamente por abscisão, factores mecânicos (vento), ou pela acção dos herbívoros (por exemplo, desfolha por insectos), ou uma combinação destes. Alguns investigadores classificam a senescência em três tipos distintos: (1) senescência monocárpica, que se dá ligada à reprodução; (2) senescência sequencial, que resulta da competição por diversos recursos entre folhas velhas e novas, folhas com diferentes localizações na copa; (3) senescência outonal, (Kozlowsky e Pallardy, 1997).

A abscisão é precedida da senescência que está relacionada com factores internos e externos à planta. Nos factores externos podem incluir-se o ensombreamento mútuo das folhas, as substâncias reguladoras de crescimento, os fenómenos ligados à reprodução; nos factores externos, a temperatura, a radiação, o fotoperíodo, agentes patogénicos, a secura ou o excesso de água (encharcamento) e a disponibilidade de elementos minerais (Kozlowsky e Pallardy, 1997). A senescência propriamente dita, o amarelecimento das folhas, envolve várias alterações bioquímicas e estruturais que incluem o declínio da fotossíntese, a degradação de pigmentos, entre os quais a clorofila (Nebel e Matile, 1992), proteólise da Rubisco e outras proteínas das folhas (Millard, 1988), decomposição de ácidos nucleicos, consumo respiratório de hidratos de carbono e de lípidos (Collier e Thibodeau, 1995), tendo como consequência a remobilização de nutrientes móveis na planta, entre os quais o N (Smart, 1994, cit por Kozlowsky e Pallardy, 1997). A remoção do N a partir das folhas senescentes envolve a hidrólise sequencial de diferentes proteínas e a exportação de aminoácidos livres resultantes. Hauck et al., 1997 registaram importantes alterações no ciclo interno do N em plantas mutantes de *Festuca pratensis*, cujas folhas não amarelecem na senescência, não ocorrendo degradação de clorofila, nem de proteínas dos tilacóides, constituintes dos complexos clorofila-proteína. Embora se mantenham verdes, estas plantas experimentam uma redução drástica das taxas de fotossíntese, uma vez que se verifica a perda de proteínas tão importantes como a Rubisco e outras envolvidas no ciclo de Calvin. Isto significa que cerca de um terço das proteínas das folhas não contribuiu para o ciclo interno do N (ver adiante), ficando imobilizado nas folhas velhas. A remobilização de N aquando da senescência nas plantas mutantes foi portanto inferior à verificada nas plantas selvagens, tendo o crescimento sido também inferior, sobretudo em condições de menor

disponibilidade de N. Aqueles autores concluíram que a clorofila parece ser mais do que um sintoma ligado ao crescimento e desenvolvimento foliar, desempenhando um papel marcante na regulação do metabolismo das proteínas e na nutrição azotada das plantas.

A exposição ao ozono, importante poluente atmosférico, provoca uma aceleração do ritmo normal da senescência das folhas (Reich e Lassoie, 1985; Wiltshire et al., 1993 cit. por Wiltshire et al., 1996), e está associada com a perda acelerada de Rubisco tanto em quantidade como em actividade (Dann e Pell, 1989). Este decréscimo nas quantidades de Rubisco tanto pode resultar de um aumento da degradação da proteína como de um decréscimo da sua síntese. Landry e Pell (1993), trabalhando com choupos, sugeriram que o ozono pode provocar modificações no estado de oxidação da Rubisco, aumentando a sua susceptibilidade à degradação proteolítica. Exposições agudas ao ozono podem provocar diminuições na síntese de Rubisco devidas a um rápido declínio de mRNA envolvido na síntese da Rubisco (Glick, et al., 1995). A aceleração da senescência pode ter implicações adversas na duração das folhas, enquanto órgãos assimiladores de carbono (Reich e Lassoie, 1985). No entanto, o rápido envelhecimento das folhas velhas pode ser um mecanismo de compensação para algumas plantas (Pell et al., 1994). Nas coníferas, o efeito do ozono sobre a fotossíntese varia com a classe de idade das mesmas. Em Agosto e Setembro, as folhas do ano de *Pinus ponderosa*, expostas ao ozono, apresentavam maior capacidade fotossintética do que as folhas mais antigas, esta estimulação fotossintética ocorreu como resultado da queda das folhas mais velhas, danificadas pelo ozono (Beyers et al., 1992). Esta compensação fotossintética nas folhas novas, localizadas no topo da copa, está relacionada com o alto teor de N presente nessas folhas, provavelmente a partir da retranslocação de N proveniente da degradação das proteínas das folhas mais velhas para as mais novas. Efeitos semelhantes foram observados em *Pinus taeda* (Baker e Allen, 1996) e em *Populus* (Greitner et al., 1994). Estes resultados corroboram a hipótese de que a repartição de N ocorre em resultado de uma remobilização eficiente, mesmo quando a senescência é provocada por um factor de stress e não estava programada (Baker e Allen, 1996).

A senescência das folhas pode ocorrer como resposta à secura estival. Estudos realizados numa gama vasta de espécies, incluindo perenifólias com longevidade foliar prolongada (p.ex., *Pinus* spp.), perenifólias de longevidade foliar curta (*Quercus suber*, *Quercus rotundifolia*), marcescentes (*Quercus pyrenaica*, *Quercus faginea*), e caducifólias, em condições semi-áridas, na meseta central da Península Ibérica,

demonstraram que a duração do período de abscisão está correlacionada com a quantidade de N remobilizado (del Arco et al., 1991). Estes autores distinguem entre momento da abscisão, relacionado com o stress hídrico (isto é, quanto mais cedo ocorrer um défice hídrico, mais cedo começarão a cair as folhas), e duração do período de abscisão, independente do hábito das espécies (Escudero e del Arco, 1987). De acordo com os resultados apresentados por del Arco et al. (1991), a taxa de retranslocação (ou eficiência de retranslocação) de um nutriente, definida pela equação:

$$TR = ((C_{FV} - C_{FL})/C_{FV}) * 100,$$

em que, C_{FV} é a concentração média de nutriente das folhas verdes ($mg.m^{-2}$) e C_{FL} é a concentração média de nutriente das folhas caídas ($mg.m^{-2}$), diminui quando aumenta a duração do período de abscisão. Assim, em condições de stress hídrico no Verão, a abscisão das folhas é mais rápida e menos N é remobilizado para armazenamento posterior. No entanto, Wendler e Millard (1996), trabalhando com *Betula pendula*, não detectaram qualquer efeito da senescência induzida por falta de fornecimento de água às plantas sobre a quantidade de N remobilizado na Primavera seguinte. As árvores compensaram a diferença de N armazenado durante o Inverno absorvendo mais N no Outono. O tempo de retenção de nutrientes nas folhas parece ser maior em condições de menor disponibilidade de nutrientes (Escudero et al., 1992). Estes autores defendem que o aumento do período de retenção de nutrientes nas folhas pode ser conseguido à custa de um aumento na longevidade das folhas e/ou um aumento da eficiência de retranslocação e concluíram que os efeitos da longevidade são muito mais importantes do que a retranslocação na eficiência de uso de nutrientes (ver também, Reich et al., 1995, a propósito dos factores que condicionam a longevidade das folhas nas árvores de folha persistente). Este efeito é particularmente evidente nas perenifólias. À medida que a longevidade das folhas decresce, o tempo de retenção de nutrientes torna-se cada vez mais dependente da retranslocação (Jonasson, 1989). Nas caducifólias, cujas folhas caem na totalidade no final do período vegetativo, o único factor de que depende o tempo de retenção de nutrientes é a retranslocação. No entanto, nestas espécies só raramente os tempos de residência de nutrientes são superiores aos das perenifólias, com excepção das que possuem menores longevidades das folhas (Escudero et al., 1992). O menor tempo de retenção de nutrientes nas espécies de folha caduca parece estar associado com a

maior concentração de nutrientes nos seus tecidos, e portanto com as suas exigências em nutrientes minerais.

A maior fertilidade do solo, e o consequente aumento do fornecimento de N às árvores, pode reduzir a eficiência de retranslocação de N durante a senescência das folhas (Boerner, 1984; Millard e Thomson, 1989; Millard e Proe, 1991). Por outro lado, um aumento do fornecimento de N às árvores no Outono pode atrasar o início da senescência, reduzindo a duração do período de senescência e consequentemente a quantidade de N retranslocado a partir das folhas (Millard e Thomson, 1989). Existem abordagens sobre a retranslocação de N a partir de tecidos senescentes como uma adaptação à deficiência de N, através de um aumento da eficiência da retranslocação em solos mais pobres em N (p. ex. Turner, 1977, cit. por Kimmins, 1997; Shaver e Melillo, 1984). Contudo, Birk e Vitousek (1986) verificaram que a proporção de N retranslocado a partir de fascículos individuais de *Pinus taeda* permanecia constante apesar de diferenças evidentes de disponibilidade de N. Outros trabalhos não mostram qualquer relação entre a remobilização de N a partir das folhas senescentes e a fertilidade do solo (Chapin e Kedrowsky, 1983; Pereira et al., 1988; Chapin e Moilanen, 1991). Nambiar e Fife (1991) concluem que um estado nutricional deficiente das folhas não induz maior eficiência de retranslocação quer de folhas novas não-senescentes, quer de folhas senescentes. No entanto, num estudo sobre a importância relativa dos factores fenotípicos e genotípicos que controlam a remoção de N a partir das folhas, Pugnaire e Chapin (1993) concluíram que uma eficiência alta de remoção de N a partir das folhas senescentes é uma resposta fenotípica a disponibilidades baixas de N e sugeriram que a absorção e reciclagem de N através da queda de folhada são proporcionalmente mais importantes para as árvores em solos férteis.

As árvores de folha caduca podem absorver N no Outono, enquanto as folhas senesçam, como se verificou em estudos realizados em plantas envasadas com areia (Millard e Thomson, 1989; Millard e Proe, 1991; Wendler e Millard, 1995). Este facto parece alterar a repartição do N nas árvores, sendo este preferencialmente distribuído pelas raízes (Weinbaum et al., 1984; Sanchez et al., 1992, cit. por Millard (1996)). Ensaios realizados em vasos com *Acer pseudoplatanus* e *Fraxinus excelsior*, e utilizando o isótopo ^{15}N como marcador, mostraram que quando era fornecido N às árvores no Outono e no Inverno em grandes quantidades, este N representava uma contribuição

para o crescimento do ano seguinte superior ao N absorvido durante o Verão anterior (Millard, 1995).

2.3.3 Formas de translocação de N

Nas árvores a translocação e retranslocação de N dá-se a distâncias consideráveis (por vezes dezenas de metros). O transporte faz-se através do xilema no sentido ascendente e no floema no sentido descendente e ascendente (Sauter e van Cleeve, 1992). No xilema, o N é translocado quer na forma inorgânica quer na orgânica, na direcção das folhas e das regiões apicais. Quando se dá a retranslocação de N das folhas senescentes para outras partes das plantas, esta faz-se através do floema. Vários estudos demonstraram que se verifica um pico de concentração de N no translocado xilémico durante a abrolhamento de gomos e o crescimento das folhas, tanto em espécies decíduas (Glavac e Jocheim, 1993, cit. em Millard, 1996) como em perenifólias (Dambrine et al., 1995).

Schubert e Boland (1990) definiram as características da molécula orgânica ideal para translocação e armazenamento de N: solúvel em água, facilitando uma rápida mobilização, quando necessário; quimicamente estável, possuindo razão carbono/azoto baixa, diminuindo assim as necessidades de esqueletos de carbono necessários à sua síntese (van den Driessche, 1984); forma facilmente disponível de N reduzido. Somente um pequeno número de compostos azotados transportados nas plantas possui estas características. As amidas asparagina, glutamina e arginina são os mais comuns (Pate, 1980; van den Driessche, 1984), sobretudo no translocado xilémico das plantas em que a assimilação de nitrato se dá nas raízes. A glutamina parece ser a forma dominante de N nos translocados xilémicos de *Salix* (Sauter, 1981), e *Populus canadensis* (Sauter e van Cleeve, 1992; Schneider et al., 1994). A arginina é um constituinte importante do translocado xilémico de muitas espécies de árvores durante o Outono e o Inverno (Sauter, 1981; Schneider et al., 1994; Schneider et al., 1996). É um composto que também funciona como forma de armazenamento de N nas plantas lenhosas (Näsholm e Ericsson, 1990; Schneider et al., 1996) e em raízes e rizomas de arbustos e herbáceas (Nordin e Näsholm, 1997). Interrogando-se sobre a arginina como forma de transporte preferencial em relação à glutamina, tanto mais que após o transporte daquela ocorre libertação de NH_3 reassimilado na forma de glutamina, Schmidt e Stewart (1998)

especulam que talvez o catabolismo da arginina possa contribuir para o fornecimento não só de N, mas também de CO₂ para a fotossíntese, em condições de limitação estomática. Um aumento das concentrações de aminoácidos nas folhas de coníferas, imediatamente antes da expansão das folhas novas (Gezelius e Näsholm, 1993 e Billow et al., 1994), parece indicar a mobilização de formas aminadas a partir de proteínas que serão retranslocadas para as novas folhas.

O nitrato também se encontra no translocado xilémico de algumas espécies de árvores (Glavac e Jocheim, 1993; Erskine et al., 1996). O nitrato não é retranslocado no floema e a sua presença no xilema indica que provavelmente a sua assimilação se dá nas folhas (Stewart et al., 1992).

2.3.4 Contribuição do ciclo interno do N para o crescimento das árvores

Esta contribuição tem sido quantificada sobretudo através de estudos de campo do balanço de N, feitos ao nível do ecossistema. Muitos desses estudos procuram quantificar o ciclo interno em povoamentos florestais de uma forma estática, comparando os diferentes nutrientes entre si numa situação pré-determinada (por exemplo, idade do corte final, permitindo conhecer as exportações de nutrientes decorrentes da extração da madeira) (p.ex. Switzer e Nelson, 1972; Anon., 1979; em Portugal, Pereira e Sardinha, 1984; Ochôa et al., 1986; Pereira et al., 1989; Alves et al., 1990). Outras abordagens relacionam o ciclo interno do N com a fertilidade do solo (p. ex. Miller et al., 1979; Nambiar e Fife, 1987; Fife e Nambiar, 1997) ou com a idade dos povoamentos florestais (p.ex., Miller, 1981; Helmisaari, 1992), ou consideram simultaneamente com a fertilidade do solo, outros factores importantes para a produtividade das florestas, como a disponibilidade de água (Pereira et al., 1989; Aronsson e Elowson, 1980). Estes estudos reduzem frequentemente o ciclo interno do N à remobilização que ocorre após a senescência e expressam o ciclo interno de forma indirecta (p.ex. Luxmoore et al., 1981, Switzer e Nelson, 1972; Cortez, 1996). Poucos estudos quantificaram o armazenamento e a remobilização de N directamente. A remobilização de N na Primavera é calculada como a quantidade removida das folhas senescentes, ou por perdas "líquidas" de N de tecidos mais velhos, muitas vezes ignorando as variações anuais na concentração das folhas e excluindo as raízes. No primeiro caso, a remoção das folhas anterior à senescência não é quantificada,

substituindo o ciclo interno de N. Além disso, a absorção de N no Outono, pode contribuir para aumentar as quantidades de N armazenadas independentemente da senescência (ver acima). No segundo caso podem ocorrer erros devidos à sub-amostragem das árvores e falhas no balanço devido à exclusão da fracção respeitante às raízes nos cálculos (Millard, 1996).

Em complemento dos ensaios de balanços de N, é possível utilizar o isótopo estável ¹⁵N como marcador, permitindo a quantificação do N absorvido num período de crescimento, e do ciclo interno do N nos períodos seguintes, a partir da recolha de N marcado. Estudos de campo desta índole foram instalados, sobretudo com árvores de fruto, permitindo calcular directamente o N remobilizado em períodos posteriores à aplicação de fertilizante marcado com ¹⁵N (Weinbaum et al., 1987, 1994; Sanchez et al., 1991; Feigenbaum et al., 1987, cit. em Millard, 1996). Os resultados destes estudos só incluem a remobilização do N proveniente do fertilizante aplicado e não o N proveniente do solo (não-marcado), pelo que subestimam a retranslocação de N para o crescimento das árvores.

Uma forma de contornar as dificuldades encontradas com a aplicação de ¹⁵N em ensaios de campo é utilizar plantas de pequenas dimensões, novas, em vasos de areia, em ambiente controlado. A vantagem destes métodos é a quantificação directa e precisa do N absorvido e do N retranslocado. A desvantagem é a impossibilidade prática de utilizar árvores de grandes dimensões nesses estudos (Millard, 1996). Os estudos com plantas novas em vasos de areia permitiram quantificar a proporção de N utilizado para o crescimento das folhas no Verão proveniente do ciclo interno, e demonstraram que a remobilização de N é uma parte importante e significativa do N utilizado no crescimento da copa. Millard (1996), citando vários trabalhos, correspondentes a várias espécies de árvores, aponta valores que variam entre 21% e 93%. Estes resultados mostraram que o ciclo interno do N não é só significativo nas árvores adultas, mas também em árvores novas, de pequenas dimensões (Kimmins, 1997).

Várias características do ciclo interno do N tornaram-se evidentes com estes estudos. Em primeiro lugar, a quantidade de N remobilizado na Primavera depende da quantidade de N armazenada e é independente do fornecimento de N a partir do solo no ano correspondente ao crescimento estudado (Millard, 1996). Os resultados obtidos em vários ensaios, com várias espécies, tanto perenifólias como decíduas, sugerem que somente a quantidade armazenada de N determina a remobilização verificada na

Primavera. A fertilização aumenta a quantidade armazenada mas não afecta a eficiência do ciclo interno. Assim a quantidade de N armazenada depende do crescimento e desenvolvimento das árvores e de factores ambientais que os favoreçam, tais como a fertilidade do solo. O impacto de acções de gestão florestal sobre o ciclo interno do N incidirá no crescimento e repartição do N e do carbono, que, por sua vez, influenciarão a capacidade de armazenamento das árvores. Em segundo lugar, a remobilização de N na Primavera providencia N para o crescimento da parte aérea antes que tenha início a absorção rápida pelas raízes (Millard e Proe, 1991, 1992). Esta realidade foi também comprovada com árvores individuais de *Acer pseudoplatanus* e *Picea sitchensis*, em ensaios de campo (Millard, 1994). Os resultados, indicaram que cerca de um terço do N total utilizado pelas folhas provinha do ciclo interno.

2.4. Utilização do isótopo ^{15}N em estudos do ciclo interno do N nas plantas.

2.4.1 Isótopos estáveis

A utilização do isótopo ^{15}N na marcação do N presente nas plantas justifica uma breve abordagem sobre isótopos estáveis.

A maior parte dos elementos químicos encontra-se na atmosfera e crosta terrestre na forma de misturas de isótopos, isto é, átomos do mesmo elemento com o mesmo número atómico mas diferentes números de massa. Os isótopos de um elemento podem ser estáveis ou não-estáveis (radioactivos).

A maior parte dos elementos com importância biológica, como o azoto ou o carbono, apresentam na Natureza dois ou mais isótopos estáveis, sendo um deles normalmente muito mais abundante que os restantes. A percentagem de um isótopo presente na crosta terrestre e na atmosfera designa-se *abundância natural* do isótopo. As variações na abundância natural dos isótopos estáveis destes elementos permitem o estudo da dinâmica de processos em diversas áreas científicas das quais se podem destacar a bioquímica, a fisiologia e a ecologia.

O quociente entre dois isótopos estáveis presentes numa amostra define uma *razão isotópica* dessa amostra. A composição isotópica de uma amostra é normalmente expressa numa notação diferencial, chamada *composição isotópica relativa*, dada pelo quociente entre razões isotópicas,

$$\delta X_p = (R_{\text{amostra}} - R_p) / R_{\text{amostra}} = (R_{\text{amostra}} / R_p - 1) (1)$$

em que, R_{amostra} e R_p são as razões de abundâncias da amostra e padrão, respectivamente, e δX_p mede o desvio da composição isotópica da amostra relativamente à do padrão.

A composição isotópica dum amostra em unidades delta é uma grandeza adimensional que se apresenta normalmente em permilagem. Para ilustrar as vantagens da notação diferencial na comparação de composições isotópicas, ver (Ehleringer e Rundel, 1988). Este procedimento permite obter maior precisão e repetibilidade das medições, bem como detectar pequenas variações produzidas tanto no curto prazo, como em intervalos de tempo mais alargados (Ehleringer e Osmond, 1991).

2.4.2 Marcação isotópica

O emprego dos isótopos permite seguir um elemento como o carbono ou o azoto, definindo a origem da aplicação, num sistema biológico formado por compartimentos (Morot-Gaudry et. al. 1995). Quando se utilizam marcadores isotópicos cria-se um sistema isotópico artificial que se sobrepõe ao sistema mássico natural pré-existente. Este sistema isotópico utiliza os mesmos processos de renovação e possui uma estrutura idêntica ao sistema mássico, sendo possível estudar as características dinâmicas do sistema a partir do sistema isotópico. O marcador isotópico utilizado deve possuir um comportamento idêntico ao do elemento que se está a seguir, e deve ser administrado em quantidades reduzidas para não perturbar o equilíbrio de massa do sistema. A marcação pode ser feita pontualmente (por impulsos), ou de forma regular, constante (escalonada) (Morot-Gaudry et. al. 1995).

2.4.3 Isótopos de azoto (N)

Existem dois isótopos estáveis de N a saber, ^{14}N e ^{15}N . A composição isotópica de ^{15}N na atmosfera é aproximadamente 0,366% do N total, sendo os restantes 99,634% compostos por ^{14}N . O primeiro valor corresponde à abundância natural de ^{15}N na atmosfera. A razão isotópica ^{14}N na atmosfera é mais ou menos constante - aproximadamente 3676 ($\times 10^6$) - e constitui o padrão de referência aceite internacionalmente para efeitos de quantificação de isótopos de azoto (Ehleringer e Osmond, 1991).

2.4.4 Terminologia

Designa-se por *abundância* ou *proporção* do isótopo ^{15}N a razão percentual entre o número de átomos ^{15}N da amostra considerada e o número total de átomos de azoto:

$$A(\%) = \frac{^{15}\text{N}}{(^{14}\text{N} + ^{15}\text{N})} \times 100$$

Define-se *excesso* do isótopo a diferença entre a abundância isotópica dada numa amostra e a abundância natural. Para o azoto o padrão de referência é o azoto da atmosfera, cuja abundância isotópica é $0,366 \pm 0,004$:

$$E(\%) = A(\%) - 0,366(\%)$$

O excesso isotópico caracteriza a percentagem de átomos ^{15}N existentes numa amostra para uma marcação isotópica.

A *taxa de marcação numa amostra* representa a proporção de átomos ^{15}N incorporados durante a marcação, em relação ao número total de átomos de N da amostra:

$$Q(\%) = \frac{E(\%)_{\text{amostra}}}{E(\%)_{\text{fonte marcada}}} \times 100,$$

se a fonte utilizada for um fertilizante enriquecido em ^{15}N , $Q(\%)$ dará a fracção de N na planta derivado do fertilizante (Anon. 1983).

A *quantidade de azoto marcado contido numa amostra* (Q) é o produto da quantidade de azoto da amostra considerada pelo seu excesso isotópico, dividido pelo excesso que foi utilizado na marcação (Hill-Cottingham e Lloyd-Jones, 1975):

$$Q(\%) = E(\%)_{\text{amostra}} \times \text{quantidade de N}_{\text{amostra}} \text{ (moles)} / E(\%)_{\text{fonte marcada}}$$

2.4.5 Espectrometria de massa

O espectrómetro de massa permite separar os isótopos de um mesmo elemento numa amostra com base na diferença de massa. O princípio da espectrometria de massa baseia-se no efeito de um campo magnético sobre partículas carregadas, verificado pela primeira vez por J.J. Thomson, em 1897. Num sistema sob pressão reduzida, um ião de massa M e carga Z pode ser acelerado por um potencial eléctrico V e injectado num campo magnético B uniforme. Nestas condições o ião vai sofrer um desvio correspondente à equação matemática dum órbita circular de raio R (Casabianca, 1995). A equação,

$$M/Z = B^2 R^2 / 2V$$

resume a relação existente entre as características do ião e a trajectória, que se deduz da equação,

$$R = 1/B \times (2V \times (m/z))^{1/2}$$

Assim, é possível calcular com precisão a trajectória de um ião m/z . Com base nestas trajectórias é possível recolher as partículas ionizadas e desviadas pelo campo magnético em colectores que convertem os impactos iónicos em corrente eléctrica.

No caso do azoto, a entidade mensurável é o azoto molecular (N_2). Os diferentes isótopos vão afectar massas específicas às moléculas de N_2 :



Os sinais 29 e 30 exprimem a contribuição do ^{15}N .

Os resultados exprimem-se sob a forma de razão isotópica em percentagem ou δ , em permilagem:

$$\delta = \left\{ \left\{ \frac{R(\text{isótopo pesado/isótopo leve})_{\text{amostra}}}{R(\text{isótopo pesado/isótopo leve})_{\text{padrão}}} \right\} - 1 \right\} \times 1000.$$

Assim, um espectrómetro de massa é fundamentalmente constituído por um sistema de admissão da amostra; a câmara de ionização; o sistema acelerador electrostático; detector e sistema de leitura. Além disso, é indispensável a criação de um elevado grau de vácuo em todo o aparelho, desde o sistema de admissão até ao detector.

Para uma descrição mais pormenorizada dos espectrómetros de massa pode consultar-se Willard et al. (1974) e Casabianca (1995).

2.5. Nutrição mineral das árvores e produtividade das florestas

2.5.1 Breve referência à nutrição mineral das árvores

Um grande número de elementos químicos pode ser detectado na composição dos tecidos vegetais, em concentrações por vezes, diminutas. Muito poucos existem em quantidades suficientes para que possam quantificar-se em percentagens. Somente a partir do princípio do século XX, se concluiu que nem a simples presença nem a concentração de um elemento químico nos tecidos vegetais poderia atestar a “essencialidade” desse elemento para as plantas. De facto, alguns elementos podem acumular-se em quantidades consideráveis e não serem essenciais enquanto outros são essenciais encontrando-se nos tecidos das plantas em quantidades ínfimas. O termo *elemento mineral essencial* foi proposto em 1939. Para que um elemento mineral seja considerado essencial, deve preencher três condições: (1) Na ausência de um elemento a planta não completa o seu ciclo de vida; (2) a função desempenhada por um elemento não pode ser substituível por outro e (3) um elemento deve estar directamente envolvido no metabolismo da planta, seja como componente estrutural ou enzimático, seja como factor interveniente em reacções químicas (Marschner, 1995). Segundo Kramer e Kozlowsky (1979) os nutrientes minerais desempenham funções tais como: constituintes dos tecidos vegetais, agentes catalíticos, reguladores osmóticos, constituintes de sistemas tamponizantes, reguladores da permeabilidade das membranas, entre outras. Os elementos essenciais passaram a classificar-se, de acordo com a sua concentração nos tecidos, em macronutrientes e micronutrientes.

A composição mineral das plantas varia com as espécies e com a disponibilidade dos elementos (e não necessariamente a sua abundância) a partir de fontes que variam na sua composição (por exemplo, os solos). A aquisição de nutrientes pelas plantas terrestres em quantidades suficientes e de uma forma equilibrada depende do investimento de uma parte considerável da biomassa produzida no crescimento e manutenção de raízes. A definição de um fornecimento adequado de um determinado nutriente depende da sua abundância e disponibilidade relativas de outros elementos, das necessidades intrínsecas de cada espécie e das condições ambientais de crescimento das plantas. A constatação de uma deficiência nutricional é empírica, e depende do

respostas das plantas assumem características típicas de condições de stress: diferentes taxas de absorção de nutrientes; modificações da morfologia e fisiologia das raízes e armazenamento e remobilização de nutrientes, parâmetros não considerados no conceito de Ingestad. (Marschner, 1995).

Uma gestão equilibrada da nutrição mineral é uma poderosa “ferramenta” para garantir não só o aumento da produtividade das florestas já existentes, como também para sustentar a produtividade no longo prazo. Vale a pena salientar alguns aspectos distintivos da nutrição mineral nas florestas (Nambiar, 1984).

A principal diferença consiste no factor tempo. Enquanto uma cultura agrícola tem uma duração anual ou bienal, um povoamento florestal pode ser gerido em períodos de produção que variam entre 4 a 14 anos no caso de plantações de produção intensiva de revoluções curtas até 100 ou mais. Numa floresta as necessidades nutricionais das árvores variam com as fases de desenvolvimento e com o local e época do ano (ver também Miller, 1995 e Miller 1981, 1984). Da mesma forma, grandes quantidades de nutrientes são devolvidas ao solo quer através das componentes hidrológicas do ciclo (escoamento pelo tronco e precipitação no interior do coberto florestal) quer através da queda anual de folhas e ramos das árvores, da morte de raízes finas e dos resíduos de produção resultantes da extração do material lenhoso. Estes nutrientes podem ser reutilizados pelas árvores que permanecem ou pelas seguintes após mineralização da matéria orgânica.

As florestas podem existir numa grande variedade de condições quanto à fertilidade do solo. Não são raras as situações de baixa fertilidade dos solos florestais. As árvores possuem a capacidade de armazenar quantidades apreciáveis de nutrientes nos seus tecidos (especialmente folhas e tronco) e de redistribuir e reutilizar esses nutrientes no crescimento a curto e longo prazo, sobretudo nutrientes móveis como o azoto, o fósforo ou o potássio. Desta maneira, é possível minimizar ou evitar os efeitos da escassez temporária ou permanente de nutrientes necessários ao crescimento.

Complexidade das relações entre fisiologia nutricional e crescimento (acumulação de carbono). À medida que crescem em povoamento, as árvores condicionam os processos do ecossistema (estrutura, microclima, balanço energético e ciclo de nutrientes) de modo variável com a idade. As práticas da silvicultura modificam estas características no sentido de favorecer as condições de obtenção das produções visadas.

crescimento da planta em resposta à aplicação de um determinado nutriente. Uma deficiência define-se como a condição para a qual um aumento da disponibilidade de um nutriente resulta num aumento do crescimento ou da capacidade de reprodução da planta. À medida que a disponibilidade do nutriente aumenta, a taxa de crescimento aumenta rapidamente, mas a concentração do nutriente não se alterará de forma significativa devido a um efeito de diluição das quantidades de nutriente na biomassa crescente, resultante do aumento da taxa de fotossíntese. Quando a condição de nutrição adequada é atingida, ou quando a limitação do crescimento da planta passou a verificar-se devido a qualquer outro factor, a aquisição do nutriente pode continuar mas a concentração aumentará, sem que se verifique aumento da biomassa. A passagem do estado de deficiência para o estado de adequação, define um estado crítico, caracterizado por uma concentração, correspondente à concentração mínima necessária para garantir um crescimento máximo. Se a aquisição de um nutriente prossegue sem se verificarem aumentos da taxa de crescimento ou da frutificação, a planta acumula o nutriente e diz-se que entrou em “consumo de luxo”. Em última instância, a planta pode atingir concentrações do nutriente ou elemento químico, que se tornem tóxicas, provocando um declínio na produção ou mesmo a morte dos tecidos (Kimmins, 1997). O nível a que um determinado nutriente se torna deficiente depende dos níveis de outros nutrientes. Assim, a disponibilidade relativa dos diferentes elementos é tão importante como a sua disponibilidade absoluta (Agren, 1988, Ingestad e Agren, 1988). Estes autores abordaram as relações entre nutrição mineral e crescimento das plantas, desenvolvendo métodos para garantir a manutenção de um estado nutricional constante das plantas quando estas crescem activamente, de forma exponencial, através do fornecimento de nutrientes em proporções optimizadas para cada espécie, de acordo com a taxa de crescimento verificada (Ingestad e Lund, 1986). Desta forma, as concentrações dos nutrientes nas plantas deveriam manter-se constantes, garantindo a fiabilidade das respostas das plantas em ensaios de nutrição mineral (Linder e Rook, 1984). Esta abordagem (conceito) foi aplicada a pequenas plantas em condições rigorosamente controladas de fornecimento de nutrientes e de crescimento e também à escala do ecossistema (Ingestad, 1987). No entanto, Marschner (1995) argumenta que as condições de ajustamento entre fornecimento de nutrientes e crescimento não são típicas das plantas no seu ambiente natural. As flutuações na disponibilidade de nutrientes são a regra nas plantas sujeitas a condições de campo. Para compensar estas flutuações as

A diversidade de tecidos fotossintéticos e respiratórios presentes nas árvores toma a interação entre o crescimento e nutrição mineral mais complexa.

As operações florestais de extração de madeira e preparação do solo para a florestação têm grande influência na manutenção da produtividade deste. Os efeitos decorrentes da perda e redistribuição de nutrientes acentuam-se em situações de produção intensiva com revoluções curtas, colocando a questão de assegurar as condições de sustentabilidade de longo prazo. Kimmins (1997) discute neste contexto os conceitos de rotações técnica, económica e ecológica. Rotação (ou revolução) técnica é o período necessário para produzir um determinado produto; rotação (ou revolução) económica corresponde ao período definido pela maximização de um critério económico-financeiro (p. ex., valor actual ou taxa interna de rentabilidade) (Alves, 1966; Klemperer, 1996); rotação ecológica é o período necessário para que uma floresta, sujeita a um plano de gestão, retorne à condição vigente anteriormente à perturbação (por exemplo, um corte final) ou assuma uma nova condição desejada, antes de uma nova perturbação. A rotação ecológica é uma função simultaneamente do grau de alteração do ecossistema florestal pela perturbação, da taxa de recuperação do próprio ecossistema (resiliência), e da frequência com que a perturbação ocorre. No caso dos aspectos relacionados com o impacto dos cortes finais e consequente exportação de nutrientes, Kimmins (1997) emprega a expressão *rotação ecológica de recuperação de nutrientes*. Neste caso, aspectos como a duração do período de produção (revolução, explorabilidade), a intensidade do aproveitamento da biomassa florestal ou os processos de reposição e disponibilização dos nutrientes essenciais para assegurar a sustentabilidade são fundamentais na gestão das florestas. Também a poluição atmosférica decorrente das actividades industriais e urbanas tem aumentado as preocupações sobre o declínio das florestas (Oren e Shulze, 1989; Schulze et al, 1989; Schultze e Ulrich, 1991; Garner, 1994).

2.5.2 O N e a produtividade florestal

O conjunto de processos ao nível celular (divisão, expansão e diferenciação) que dão origem ao aumento de peso e dimensões, bem como à diferenciação de novos órgãos, ao longo da vida das plantas designa-se por crescimento. Este decorre do desenvolvimento ontogénico e da produção de matéria seca, sendo a taxa de crescimento

determinada em larga medida pelas condições ambientais (Kozlowsky et al., 1991). Um dos factores mais importantes na caracterização da “estratégia” de crescimento das plantas é o padrão de distribuição da biomassa, isto é, de que forma os recursos utilizados pelas plantas são investidos nas folhas, raízes ou caules. Posto de outra forma, como é que recursos como os nutrientes minerais em geral, e o N em particular, são distribuídos entre órgãos de aquisição de recursos a partir da atmosfera ou do solo e órgãos de armazenamento para utilização futura.

Na figura 2.4 estão patentes de forma esquemática as relações entre crescimento e a nutrição mineral. A taxa de crescimento das plantas é determinada pela fotossíntese e pelo padrão da partição do carbono fixado entre os tecidos produtivos (fotossintéticos) e tecidos somente respiratórios ou de acumulação (não-fotossintéticos) (Pereira, 1994). Para relacionar a nutrição azotada com o crescimento, é importante compreender de que forma aquela influencia os processos citados anteriormente.

É ao nível da copa, onde se localizam os órgãos assimiladores de carbono, que se produz a energia necessária à síntese dos materiais que vão constituir o lenho das árvores, nomeadamente a celulose. As taxas de fotossíntese na copa das árvores são determinadas pela combinação da área foliar da copa, capacidade fotossintética das folhas e intensidade da radiação.

A produtividade primária líquida (NPP) da parte aérea de um povoamento florestal pode ser estimada a partir da quantidade de radiação interceptada pela copa das árvores (Jarvis e Leventerz, 1983; Landsberg e McMurtrie, 1985; Russel et al., 1989), de acordo com a função:

$$NPP = \epsilon \cdot f \cdot Q_0,$$

em que, ϵ é o quociente da biomassa produzida/ radiação solar interceptada pelas folhas (também designado “eficiência de uso da radiação”, f é a média da fracção da radiação solar interceptada durante a estação de crescimento, e Q_0 , a radiação solar incidente acumulada. O valor de f é função do coeficiente de extinção de radiação (k) e do índice de área foliar (IAF), que incorpora aspectos estruturais da copa, como a sua arquitectura, a densidade de área foliar e a distribuição espacial das folhas individuais (Pereira et al., 1994; Kriedemann e Cromer, 1996): $f \approx (1 - \exp(-k \cdot L))$, em que $L = IAF$

(Pereira et al., 1994). O produto $f \cdot Q_0$, referido a um período determinado, representa a radiação interceptada, por sua vez relacionada com o integral do IAF no tempo (duração de área foliar, LAD) (Pereira, 1994). A adição de N estimula a expansão da copa, afectando directamente o valor de L (Cromer et al., 1991; Pereira et al., 1994). O aumento da produção de hidratos de carbono, após a aplicação de um fertilizante azotado pode reflectir um aumento do número, dimensões e longevidade das folhas, assim como um aumento do período de tempo em que aquelas se mantêm fotossinteticamente activas (Linder e Rook, 1984). Pereira et al. (1994) num ensaio com *Eucalyptus globulus*, em que se testou a influência do fornecimento de água e nutrientes sobre a produtividade primária, verificou um aumento inicial rápido no índice de área foliar (IAF) dos povoamentos fertilizados e regados, resultando numa maior duração de área foliar. Os maiores valores de IAF verificados nas parcelas que foram regadas e fertilizadas, resultaram de aumentos do número de folhas, da área das folhas individuais e da área foliar específica (SLA). Pereira et al. (1989) atribuem maior importância à contribuição do factor número de folhas para a área total das copas de *Eucalyptus globulus*. É a quantidade de tecido fotossintético, mais do que a sua actividade, que determina a produtividade (Pereira, 1994).

A distribuição do N na copa também é afectada, tanto em árvores novas como em árvores de maiores dimensões (Leuning et al., 1991a e Leuning et al., 1991b; Pereira et al., 1992b), verificando-se valores superiores da concentração de N nas folhas mais novas do exterior e topo da copa, e consequentemente maior potencial de assimilação de carbono pela copa no seu todo. Leuning et al. (1991a) verificou um aumento da taxa de fotossíntese (referida à área das folhas) durante os primeiros meses de crescimento em *Eucalyptus grandis*, mas passados 16 meses as taxas já eram semelhantes em árvores fertilizadas e não fertilizadas. A grande diferença verificada na assimilação de C pela copa deveu-se portanto predominantemente ao aumento da área foliar. Kriedemann e Cromer (1996) sugerem, baseando-se nestas observações, que a eficiência do uso do N na produção lenhosa é uma consequência dos processos de assimilação e de repartição, ambos afectados pela nutrição azotada. Assim, o uso do N enquanto factor limitante da assimilação de C e da produtividade das árvores passa por um padrão eficiente de repartição de N na copa (Hirose e Werger, 1987). Vários estudos sobre repartição de N nas copas de árvores e de espécies não-arbóreas, indicam que o N não está distribuído de forma aleatória nas copas. As folhas das zonas mais iluminadas das copas (topo e

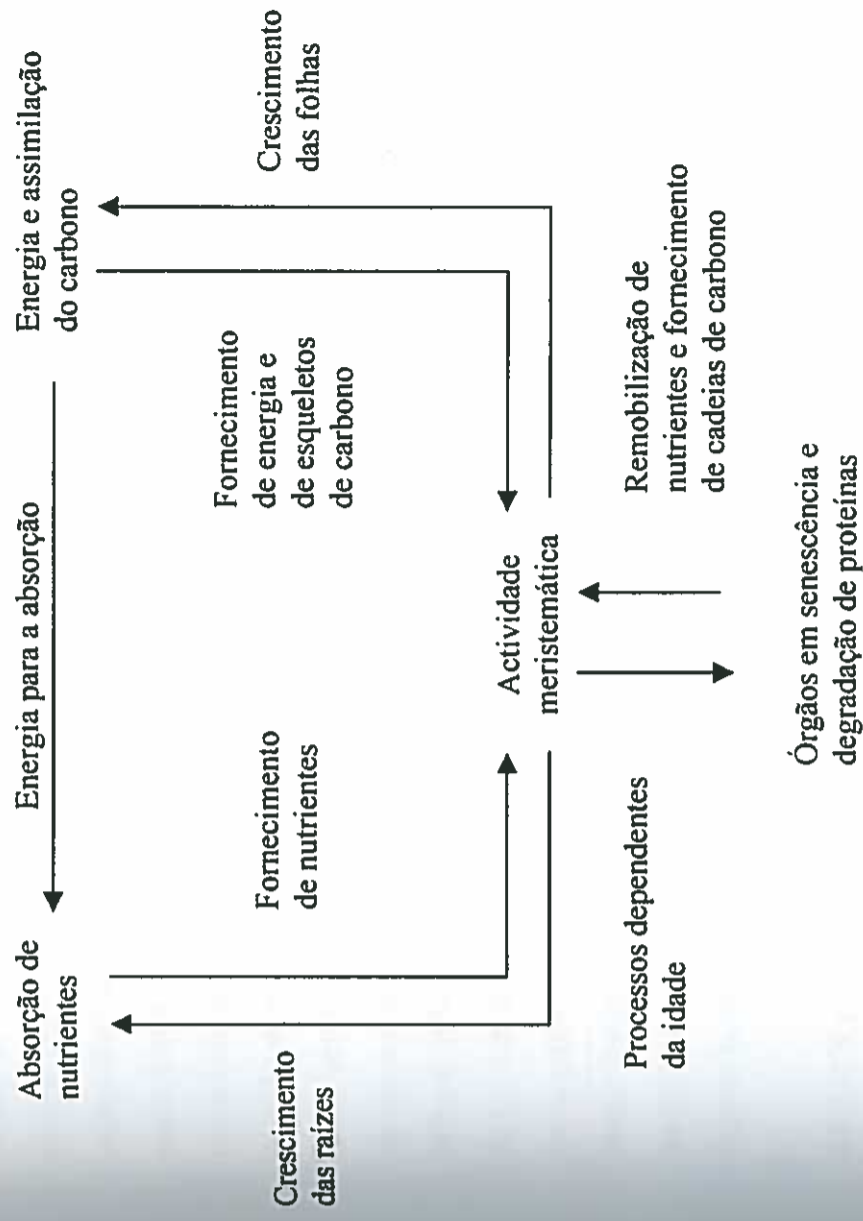


Figura 2.4. Inter-relação entre nutrientes absorvidos e o crescimento das plantas

enzimática (nomeadamente na carboxilação) e na condutância dos estomas para o CO_2 (Kozlowsky e Pallardy, 1997).

Field e Mooney (1986) coligiram dados de uma grande variedade de fontes em que o N varia devido à nutrição ou à idade das folhas. Mostraram que, embora a variação dos dados seja elevada, todos os dados respeitantes às plantas em C_3 se agrupavam em torno de uma linha recta que relaciona a taxa de fotossíntese líquida em condições de saturação de luz (P_{max}) por unidade de peso seco com a concentração de N das folhas. A correlação verificada é ainda maior se as plantas forem agrupadas em plantas anuais *versus* perenes. Verificam-se correlações lineares fortes entre fotossíntese e concentração de N das folhas em várias espécies lenhosas (ver, por exemplo, Larcher, 1995; Kozlowsky e Pallardy, 1997). Os autores defendem que a relação é suficientemente geral para ser considerada fundamental para todas as espécies. Esta relação permite calcular a eficiência fotossintética do uso do azoto (PNUE), como a razão entre a taxa de fotossíntese e a concentração de azoto das folhas com base na área (Larcher, 1995). Define-se também a eficiência de uso do N (NUE) como o acréscimo de biomassa por unidade de azoto incorporado num determinado período de tempo (Hirose e Werger, 1987b; Birk e Vitousek, 1986), ou produtividade do N (Agren, 1985).

Entretanto, a variação verificada na relação P_{max}/N é evidente e adquire maior importância quando os cálculos são referidos à área foliar. No entanto, existe uma relação estreita entre área foliar específica (área foliar por unidade de peso da folha, SLA) e teor de N das folhas: valores mais elevados de SLA correspondem a teores de N também mais elevados (por exemplo, Pereira et al., 1994a). Portanto, diferenças na SLA podem gerar variação na relação geral P_{max}/N (Evans, 1989). Ryle et al., 1992, propõe quatro causas para a variação verificada: (1) as espécies podem diferir no padrão de distribuição de N entre compostos azotados fotossintéticos e não-fotossintéticos; (2) as espécies podem diferir na partição de N entre compostos azotados associados à fotossíntese com consequências nos valores de P_{max} ; (3) as espécies podem diferir na actividade específica dos compostos fotossintéticos azotados (Rubisco, complexos pigmentos-proteínas), (4) a P_{max} pode ser limitada por factores alheios à nutrição azotada nas diferentes espécies, por exemplo, ao nível das limitações estomáticas à difusão de CO_2 devidas ao stress hídrico (Tenhunen et al., 1986; Chaves, 1991; Pereira et al., 1987; Pereira e Pallardy, 1989).

enzimática (nomeadamente na carboxilação) e na condutância dos estomas para o CO₂ (Kozlowsky e Pallardy, 1997).

Field e Mooney (1986) coligiram dados de uma grande variedade de fontes em que o N varia devido à nutrição ou à idade das folhas. Mostraram que, embora a variação dos dados seja elevada, todos os dados respeitantes às plantas em C₃ se agrupavam em torno de uma linha recta que relaciona a taxa de fotossíntese líquida em condições de saturação de luz (P_{max}) por unidade de peso seco com a concentração de N das folhas. A correlação verificada é ainda maior se as plantas forem agrupadas em plantas anuais *versus* perenes. Verificam-se correlações lineares fortes entre fotossíntese e concentração de N das folhas em várias espécies lenhosas (ver, por exemplo, Larcher, 1995; Kozlowsky e Pallardy, 1997). Os autores defendem que a relação é suficientemente geral para ser considerada fundamental para todas as espécies. Esta relação permite calcular a eficiência fotossintética do uso do azoto (PNUE), como a razão entre a taxa de fotossíntese e a concentração de azoto das folhas com base na área (Larcher, 1995). Define-se também a eficiência de uso do N (NUE) como o acréscimo de biomassa por unidade de azoto incorporado num determinado período de tempo (Hirose e Werger, 1987b; Birk e Vitousek, 1986), ou produtividade do N (Agren, 1985).

Entretanto, a variação verificada na relação P_{max}/N é evidente e adquire maior importância quando os cálculos são referidos à área foliar. No entanto, existe uma relação estreita entre área foliar específica (área foliar por unidade de peso da folha, SLA) e teor de N das folhas: valores mais elevados de SLA correspondem a teores de N também mais elevados (por exemplo, Pereira et al., 1994a). Portanto, diferenças na SLA podem gerar variação na relação geral P_{max}/N (Evans, 1989). Ryle et al., 1992, propõe quatro causas para a variação verificada: (1) as espécies podem diferir no padrão de distribuição de N entre compostos azotados fotossintéticos e não-fotossintéticos; (2) as espécies podem diferir na partição de N entre compostos azotados associados à fotossíntese com consequências nos valores de P_{max} ; (3) as espécies podem diferir na actividade específica dos compostos fotossintéticos azotados (Rubisco, complexos pigmentos-proteínas), (4) a P_{max} pode ser limitada por factores alheios à nutrição azotada nas diferentes espécies, por exemplo, ao nível das limitações estomáticas à difusão de CO₂ devidas ao stress hídrico (Tenhunen et al., 1986; Chaves, 1991; Pereira et al., 1987; Pereira e Pallardy, 1989).

Tanto Evans (1989) como Field e Mooney (1986) destacam os valores apresentados para arbustos e árvores de folha persistente, em particular *Prunus ilicifolia*, que evidencia taxas fotossintéticas muito mais baixas por unidade de N, provavelmente devido à alocação de quantidades substanciais de N em compostos não-fotossintéticos, talvez relacionada com a longevidade das folhas. Também a relação entre SLA e N pode estar relacionada com a alocação de N em compostos não-fotossintéticos das folhas. Valores baixos de SLA estão associados a massa celular ou número de células elevados, podendo corresponder a uma predominância relativa de compostos azotados não-fotossintéticos nas folhas em condições de menor disponibilidade de N (Ryle et al., 1992).

Duas fracções principais de compostos azotados associados à fotossíntese podem ser individualizadas. A maior, constituindo 30% do N das folhas, é composta pelas proteínas solúveis envolvidas na fixação de CO₂, fotorrespiração, síntese de amido e de sacarose. Inclui as enzimas do ciclo de Calvin e a Rubisco. A segunda fracção é constituída pelas proteínas das membranas dos tilacóides, incluindo os fotossistemas I e II, os complexos clorofila-proteínas captadores de luz, factor de acoplamento (*coupling factor*) e outras proteínas transportadoras de electrões, representando 25% do N das folhas (Chapin et al., 1987; Evans e Seemann, 1989). A quantidade de N presente nesta fracção parece depender do ambiente luminoso a que as folhas estão expostas. Quando as folhas crescem sujeitas a diferentes intensidades luminosas, ou quando o seu ambiente luminoso muda, dá-se uma aclimação do sistema fotossintético das folhas. Esta aclimação reflecte as mudanças verificadas ao nível do equilíbrio relativo entre diferentes proteínas das folhas (Evans 1989b). Em geral, a aclimação ao ensombreamento resulta num decréscimo da capacidade fotossintética por unidade de N da folha. A quantidade de clorofila por unidade de N em *Populus tremula*, *Tilia cordata* e *Corylus avellana*, aumenta quando desce a PPF, mas a capacidade de transporte de electrões permanece constante (Kull e Niinemets, 1998). A actividade da Rubisco e a taxa de fotossíntese estão intimamente relacionadas (p. ex. Evans, 1989). Quando a concentração de N aumenta nas folhas, a concentração de Rubisco e a capacidade fotossintética também tendem a aumentar. No entanto, sobretudo em condições de abundância de N, a actividade de N pode diminuir, evidenciando, a dualidade da Rubisco como proteína de armazenamento e enzima de fixação do CO₂ (Millard, 1988). Evans (1989) refere a possibilidade desse decréscimo de actividade da Rubisco resultar de um

declínio da pressão parcial de CO₂ na superfície dos tilacóides, onde se dá a carboxilação. Devido à abundância da Rubisco nas folhas e à grande proporção de N das folhas que pode ser remobilizada, durante a senescência ou na ausência dela, a Rubisco funciona como um composto de armazenamento de N, mas as folhas podem conter outras proteínas de armazenamento (Ryle et al., 1992). A utilização do N no interior da copa é uma função quer da competição entre folhas quer da repartição do N dentro das folhas. Uma distribuição não-uniforme de N no interior da copa pode ocorrer aquando da senescência das folhas mais velhas do interior da copa, com a consequente remobilização de N para as folhas novas no topo e periferia da copa (Evans, 1989b).

2.5.4 O N e a partição do C no crescimento das árvores

As plantas lenhosas em geral, e as árvores em particular, distinguem-se das restantes plantas por apresentarem crescimento secundário e pela conversão contínua de tecido estrutural em biomassa não-viva e portanto, não-respiratória. Esta biomassa permanece uma parte integral da árvore, essencial ao seu funcionamento, desempenhando funções de suporte, como constituinte do tronco e ramos, e parcialmente, funções como sistema condutor de água e nutrientes. Os tecidos secundários desempenham também uma função de armazenamento, de nutrientes e de hidratos de carbono. A formação de material lenhoso contribui para melhorar o balanço de carbono, devido às economias decorrentes da redução das perdas de CO₂ na respiração (Schulze, 1982). O crescimento do tronco das árvores (normalmente quantificado em volume) está relacionado com expansão da copa e com a taxa de fotossíntese (Grove et al., 1996). A área foliar (ou o índice de área foliar) está normalmente bem correlacionado com a área basal e a biomassa do tronco (Kimmins, 1997). Verificam-se normalmente aumentos da produção de biomassa do tronco quando se aplicam fertilizantes contendo N (por exemplo, Cromer et al. (1993) em *Eucalyptus grandis*, Cromer e Williams (1982), Pereira et al. (1989) e Pereira et al. (1994) em *Eucalyptus globulus* ou Fife e Nambiar (1997), em *Pinus radiata*).

A longevidade das plantas lenhosas está relacionada com a permanência dos tecidos secundários constituintes das plantas, embora se verifique uma renovação parcial dos tecidos que dá origem à folhada. A longevidade, aliada à biomassa elevada, das árvores, aumenta a complexidade das relações entre o crescimento e a fotossíntese,

devido aos padrões de partição da biomassa durante o desenvolvimento das árvores (aumentando a proporção de tecidos lenhosos com a idade), e às diferentes escalas temporais em que os ciclos internos (armazenamento e retranslocação) de C e de N podem ocorrer (Chapin et al., 1990; Pereira, 1994).

O efeito do N sobre o crescimento das árvores resulta de alterações: (1) na distribuição da biomassa entre componentes aéreas e subterrâneas (razão raiz/parte aérea); (2) na área foliar específica (área por unidade de peso das folhas); (3) na capacidade fotossintética (Sands et al., 1992). O efeito de longo prazo mais importante de uma deficiência de N sobre a fotossíntese é a redução do crescimento das folhas, tendo como consequência o decréscimo da assimilação global de C. Em contrapartida, a aplicação de N em plantas jovens de *Pinus taeda* provocou um aumento de 50% da área foliar (Vose, 1988; Vose e Allen, 1988, cit. por Kozlowsky e Pallardy, 1997) e a aplicação de fertilizantes NPK em árvores de *Eucalyptus grandis* com 9 anos provocou um aumento da biomassa foliar de 60% (Birk e Turner, 1992). Quando é fornecida uma quantidade abundante de N às plantas, verifica-se que muitas vezes, a distribuição de assimilados (partição de C) se altera, havendo uma maior repartição da biomassa para a parte aérea, sobretudo as folhas (Cromer e Jarvis, 1990). Da mesma forma, a razão raiz/parte aérea aumenta com a redução de N (Ericsson, 1995; Pereira et al. 1994). O aumento relativo da biomassa das raízes pode estar relacionado com uma melhoria das condições de aquisição de N, compensando a menor disponibilidade de sete recurso.

Esta resposta é descrita geralmente em termos de um *equilíbrio funcional* entre as folhas e as raízes (Brouwer, 1983, cit. por Lambers et al, 1998). Isto significa que quando os recursos adquiridos através das raízes (água e nutrientes) estão em falta, o crescimento das raízes é favorecido em detrimento das folhas (órgãos assimiladores de carbono). Este conceito coloca a questão da aquisição do N e do C para o crescimento das plantas em dois planos que importa salientar. Em primeiro lugar, as aquisições de C e de N não devem ser analisadas em separado. Com efeito, em plantas transgênicas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) transformadas para apresentarem quantidades decrescentes de Rubisco, e consequentemente, taxas decrescentes de fotossíntese, a deficiência de N provocou uma inibição do crescimento, com acumulação de amido nas folhas (Stitt e Schulze, 1994; Fichtner et al, 1994). Assim, a maior disponibilidade de carbono promove o crescimento somente quando o N está presente em quantidades suficientes nas plantas. Da mesma forma, quando o N é abundante mas a capacidade

fotossintética é reduzida, verifica-se uma acumulação de N. Em segundo lugar, o crescimento das plantas não ocorre de forma exponencial equilibrada, embora muitos estudos utilizem essa abordagem, conveniente do ponto de vista matemático, mas está sujeito a situações de disponibilidade oscilante de recursos, afectando as respostas em termos de aquisição e partição dos recursos. Os mecanismos de regulação do crescimento neste contexto são, em grande parte, desconhecidos. O armazenamento (de C ou de N) permite que o crescimento decorra mesmo quando as condições para a fotossíntese ou para a aquisição de N pelas raízes não são favoráveis. A regulação da retranslocação de C e/ou de N permanece em grande medida desconhecida, embora existam evidências do envolvimento de fitohormonas na sinalização da disponibilidade de N nas raízes para as folhas, através do xilema (Van der Werf e Nagel, 1996), bem como do envolvimento de hidratos de carbono na sinalização do estímulo para o crescimento das raízes a partir das folhas, através do floema (Lambers e Atkin, 1995; Van der Werf e Nagel, 1996). A acumulação de hidratos de carbono nas folhas pode originar uma redução da fotossíntese através de um mecanismo de repressão de um gene (*rbcS*), responsável pela síntese de uma subunidade da Rubisco (Van Oosten e Besford, 1994). A repressão pelos hidratos de carbono resulta na mobilização de N armazenado na Rubisco e sua redistribuição para outros órgãos das plantas (Paul e Stitt, 1993), constituindo um mecanismo condicionador da repartição de recursos provocada por desequilíbrios entre *source:sink* impostos às plantas por deficiências de N (Paul e Driscoll, 1997). Estes autores sugerem que componentes do metabolismo do N associados à remobilização da Rubisco estão também envolvidos na repartição de assimilados devida a desequilíbrios entre *source:sink*.

fotossintética é reduzida, verifica-se uma acumulação de N. Em segundo lugar, o crescimento das plantas não ocorre de forma exponencial equilibrada, embora muitos estudos utilizem essa abordagem, conveniente do ponto de vista matemático, mas está sujeito a situações de disponibilidade oscilante de recursos, afectando as respostas em termos de aquisição e partição dos recursos. Os mecanismos de regulação do crescimento neste contexto são, em grande parte, desconhecidos. O armazenamento (de C ou de N) permite que o crescimento decorra mesmo quando as condições para a fotossíntese ou para a aquisição de N pelas raízes não são favoráveis. A regulação da retranslocação de C e/ou de N permanece em grande medida desconhecida, embora existam evidências do envolvimento de fitohormonas na sinalização da disponibilidade de N nas raízes para as folhas, através do xilema (Van der Werf e Nagel, 1996), bem como do envolvimento de hidratos de carbono na sinalização do estímulo para o crescimento das raízes a partir das folhas, através do floema (Lambers e Atkin, 1995; Van der Werf e Nagel, 1996). A acumulação de hidratos de carbono nas folhas pode originar uma redução da fotossíntese através de um mecanismo de repressão de um gene (*rbcS*), responsável pela síntese de uma subunidade da Rubisco (Van Oosten e Besford, 1994). A repressão pelos hidratos de carbono resulta na mobilização de N armazenado na Rubisco e sua redistribuição para outros órgãos das plantas (Paul e Stitt, 1993), constituindo um mecanismo condicionador da repartição de recursos provocada por desequilíbrios entre *source:sink* impostos às plantas por deficiências de N (Paul e Driscoll, 1997). Estes autores sugerem que componentes do metabolismo do N associados à remobilização da Rubisco estão também envolvidos na repartição de assimilados devida a desequilíbrios entre *source:sink*.

3 Material e Métodos

Neste capítulo descrevem-se os métodos e materiais utilizados nos ensaios a que se referem os capítulos seguintes. O objectivo é evitar repetição de descrições ao longo da tese. Os métodos e materiais específicos de cada ensaio são referidos em cada capítulo.

3.1. Determinação da biomassa

A determinação da biomassa foi feita através da medição do peso seco das várias componentes das plantas, após secagem em estufa. Sempre que foi necessário obter subamostras do material vegetal para futuras análises imediatamente após a medição do peso fresco, a determinação do peso fresco total das plantas e das várias componentes fez-se da seguinte forma: após retirar as várias subamostras mediu-se o peso fresco do restante material, depois procedeu-se à secagem deste material, seguindo-se a pesagem. Com base no peso seco e no peso fresco determinou-se o teor de humidade, segundo a fórmula:

$$H(\%) = (PH - PS) * 100 / PH$$

em que,

H - Teor de humidade (%)

PH - Peso fresco de biomassa (g)

PS - Peso seco de biomassa (g)

Com base neste teor de humidade e no peso húmido das subamostras, determinou-se o respectivo peso seco, ficando a saber-se o peso seco total da planta e das várias componentes.

3.2. Medição da área foliar

A área foliar total de cada planta foi obtida por medição de todas as folhas num medidor de área foliar LI-3000A (LI-COR Inc., Lincoln, Nebraska, U.S.A.). Para cada planta efectuaram-se três medições de todas as folhas e o valor considerado correspondeu ao valor médio dessas três determinações. Todos os discos foliares recolhidos para análises posteriores foram igualmente contabilizados.

3.3. Parâmetros da análise de crescimento

1) Taxa relativa de crescimento (RGR), definida como o acréscimo de biomassa por peso seco pré-existente e por unidade de tempo (Hunt, 1978).

$$\text{RGR (g.g}^{-1}\text{ . semana}^{-1}\text{)} = (\ln W_2 - \ln W_1) / (t_2 - t_1)$$

em que,

W_1 - peso seco no tempo t_1 (g)

W_2 - peso seco no tempo t_2 (g)

$t_2 - t_1$ - intervalo de tempo entre duas colheitas de biomassa (semana)

2) Razão do peso foliar (LWR), corresponde à razão da biomassa foliar seca pela biomassa total da planta.

$$\text{LWR} = W_f / W$$

em que,

W_f - peso seco das folhas (g)

W - peso seco total (g)

3) Razão do peso caulinar (SWR), diz respeito à razão entre a biomassa de caule e a biomassa total da planta,

$$\text{SWR} = W_s / W$$

em que,

W_s - peso seco do caule (g)

W - peso seco total (g)

4) Razão do peso radicular (RWR), corresponde à razão da biomassa de raízes pela biomassa total da planta,

$$\text{RWR} = W_r / W$$

em que,

W_r - peso seco das raízes (g)

W - peso seco total (g)

5) Razão raiz/parte aérea (R/S), refere-se à razão da biomassa das raízes pela biomassa da parte aérea (folhas e caule).

$$\text{RSR} = W_r / (W_f + W_s)$$

em que,

W_r - peso seco das raízes (g)

W_f - peso seco das folhas (g)

W_s - peso seco do caule (g)

6) Razão de área foliar (LAR), corresponde à razão da área foliar pela biomassa total da planta e caracteriza a dimensão relativa do aparelho assimilador relativamente à biomassa respiratória.

$$\text{LAR (cm}^2\text{ . g}^{-1}\text{)} = A_f / W$$

em que,

A_f - área foliar (cm²)

W - peso seco total (g)

7) Área foliar específica (SLA) representa a razão entre a área foliar e a biomassa foliar seca.

$$SLA \text{ (cm}^2 \cdot \text{g}^{-1}\text{)} = A_f / W_f$$

em que,

A_f - área foliar (cm²)

W_f - peso seco das folhas (g)

3.4. Composição química das plantas

1) Azoto marcado (¹⁵N) e total

A quantificação do azoto, nomeadamente do azoto marcado (¹⁵N) e do azoto total existente nos tecidos amostrados, foi feita com um espectrómetro de massa ANA-SIRA (VG Isogas, Middlewich, Cheshire, U.K.) (Millard e Neilsen, 1989). Estas determinações foram feitas no Macaulay Land Use Research Institute (MLURI) em Aberdeen (Escócia). Os cálculos efectuados para determinar o teor e concentração do azoto marcado foram os seguintes:

a) Teor de azoto total

$$N \text{ CONT (mg)} = DW \cdot \%N \cdot 10$$

em que,

DW - peso seco da componente (g)

%N - concentração de azoto na amostra

b) Quantidade de azoto ¹⁵N na subamostra

$$TOT \text{ }^{15}\text{N(mg)} = (WTN \cdot 15 \cdot \%^{15}\text{N Enriq}) / [(15 \cdot \%^{15}\text{N Enriq}) + 14 \cdot (100 - \%^{15}\text{N Enriq})]$$

em que,

WTN - azoto total na subamostra (mg)

¹⁵N Enriq - ¹⁵N na subamostra, determinado no espectrometro de massa.

O TOT ¹⁵N dá a proporção de azoto marcado relativamente ao azoto total existente na subamostra.

c) Quantidade de azoto marcado devido à abundância natural de ¹⁵N.

$$WT \text{ BCK (mg)} = (WTN \cdot 3,9204) / 1000$$

em que,

WT BCK - peso de azoto marcado devido à abundância natural (mg)

WTN - azoto total na subamostra (mg)

Abundância natural = 0,366 atom. % ¹⁵N

$$(15 \cdot 0,366) / [(15 \cdot 0,366) + 14 \cdot (100 - 0,366)] = 3,9204 \cdot 10^{-3}$$

d) Quantidade de azoto marcado enriquecido artificialmente.

$$WT \text{ }^{15}\text{N (mg)} = TOT \text{ }^{15}\text{N} - WT \text{ BCK}$$

em que,

TOT ¹⁵N - peso total de azoto marcado na subamostra (mg)

e) Concentração de azoto marcado na amostra

$$CONC \text{ }^{15}\text{N (mg} \cdot \text{g}^{-1}\text{)} = WT \text{ }^{15}\text{N} \cdot 1000 / WTN$$

em que,

WT ¹⁵N - peso de azoto marcado enriquecido artificialmente (mg)

f) Concentração de azoto absorvido (proveniente da solução nutritiva)

$$FERT \text{ N (g} \cdot \text{g}^{-1}\text{)} = (CONC \text{ }^{15}\text{N} \cdot EF) / 1000$$

em que,

FERT N - quantidade de azoto absorvido por g de tecido (g. g⁻¹)

CONC ^{15}N - concentração de azoto marcado na amostra ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)
 EF - equivalente de fertilização (100/abundância da amostra)

g) Quantidade de azoto proveniente da solução nutritiva no tecido.

$$\text{N UPT (mg)} = \text{FERT N} * \text{N CONT}$$

em que,

N CONT - quantidade de azoto no tecido (mg)

h) Quantidade de ^{15}N remobilizado

$$\text{N REM (mg)} = \text{N CONT} - \text{N UPT}$$

em que,

N CONT - quantidade de azoto no tecido (mg)

N UPT - quantidade de azoto proveniente da solução nutritiva no tecido (mg)

2) Azoto total

Sempre que necessário determinou-se a concentração de azoto total pelo método de Kjeldahl, usando para o efeito um analisador Kjeltac Auto 1030 (Tecator, Sweden) associado a um sistema de digestão Tecator.

3.5. Capacidade fotossintética

Uma definição corrente de capacidade fotossintética é a taxa de fotossíntese obtida quando todos os factores externos estão próximo do óptimo, com excepção da concentração de CO_2 que está ao nível natural ou seja, 330 ppm (Linder e Rook, 1984). Todavia a avaliação da capacidade real do aparelho fotossintético da folha implica que a barreira estomática à difusão do CO_2 seja vencida e as medidas sejam feitas em condições de saturação de CO_2 (Pereira et al., 1992; Quick et al, 1992). A capacidade fotossintética foi determinada num eléctrodo de oxigénio modelo LD2 (Hansatech

Instruments Ltd, Norfolk, U.K.). O eléctrodo de oxigénio permite quantificar a taxa fotossintética em discos foliares, baseando-se no pressuposto de que a taxa de libertação de O_2 dos discos foliares, quando iluminados e em presença de CO_2 , é proporcional à intensidade da corrente estabelecida entre o ânodo e o cátodo do eléctrodo (Delieu e Walker, 1981). Com a utilização do eléctrodo de oxigénio pretende-se eliminar as resistências à difusão do CO_2 de forma a ter uma concentração saturante ao nível dos locais de carboxilação, inibindo a fotorrespiração. Neste caso, a medida da libertação de O_2 pode ser vista como uma medida da fotossíntese ao nível do cloroplasto. Com este tipo de medições, é possível obter informação muito útil para a interpretação de limitações e eficiências do aparelho fotossintético.

Este eléctrodo é composto por um pólo de prata e outro de platina emersos e ligados por um electrólito, ambos colocados num disco de resina epóxica. Quando uma pequena voltagem é aplicada entre os dois pólos, os electrões movem-se do pólo de prata, deixando-o positivamente carregado (ânodo), para o pólo de platina tornando-o negativamente carregado (cátodo). A medida que se aumenta o potencial eléctrico para 600-700 mV, o oxigénio é reduzido na superfície do cátodo, inicialmente para peróxido de hidrogénio (H_2O_2) de forma que a polaridade tende a anular-se à medida que os electrões são dados ao oxigénio (que funciona como um aceitador de electrões). Quando o circuito eléctrico é completado com uma película de uma solução electrolítica (tal como o KCl que se ioniza em K^+ e Cl^-), a corrente eléctrica restabelece-se e permite reacções de oxi-redução: o oxigénio libertado dos discos foliares funciona como um aceitador de electrões (reduz-se) e o pólo de prata funciona como dador de electrões (oxida-se). A corrente gerada é então convertida num sinal digital numérico, visível numa caixa de controlo modelo CB1 - D (Hansatech Instruments Ltd., Norfolk, U.K.).

A calibração do eléctrodo foi feita injectando 1 ml da mistura de gases (igual à existente no interior da câmara) e registando o aumento de voltagem correspondente para uma situação de equilíbrio. Na determinação da capacidade fotossintética, para cada planta, utilizaram-se cinco discos foliares com uma área total de $3,54 \text{ cm}^2$. As determinações foram efectuadas nas seguintes condições: temperatura controlada de 25°C mantida por um banho-maria, modelo F10-UC (Julabo Labortchnik, GmbH, Sulbak/Schwarzwald, Germany), CO_2 saturante com uma concentração de 5%, libertada de uma solução saturada de hidrogenocarbonato de sódio, segundo a reacção de dissociação $\text{NaHCO}_3 \rightarrow \text{NaOH} + \text{CO}_2$ e luminosidade saturante (previamente

estabelecida, 1050 μE). A fonte de radiação fotossinteticamente activa utilizada foi uma lâmpada de Bjorkman, modelo LS2 (Hansatech Instruments Ltd, Norfolk, U.K.).

A capacidade fotossintética foi medida em termos de libertação de oxigénio, pelo que foi necessário determinar a concentração de oxigénio na mistura de gases. Para tal utilizou-se a seguinte fórmula:

$$[\text{O}_2] (\mu\text{mol} \cdot \text{ml}^{-1}) = 0,21 * (100 - [\text{CO}_2]) / 22,414 * F$$

em que,

$[\text{O}_2]$ - concentração de oxigénio na mistura de gases ($\mu\text{mol} \cdot \text{ml}^{-1}$).

0,21 - volume de uma mole de oxigénio (μl).

$[\text{CO}_2]$ - concentração de CO_2 na mistura (v:v)

22,414 - volume ocupado por 1 μmol de gás (μl)

F - factor de correcção para a temperatura ($273/(273+T^\circ)$)

Assim para a calibração do eléctrodo a uma temperatura de 25°C , utilizou-se 1 ml de mistura gasosa contendo CO_2 em concentração de 5% e 8,15 μmol de oxigénio.

A taxa de libertação fotossintética de oxigénio (A_{max}) foi determinada da seguinte forma:

$$A_{\text{max}} (\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}) = (\Delta 2 * [\text{O}_2] / \Delta t) * 10^4 / \Delta t * a * 60$$

em que,

$\Delta 2$ - acréscimo de voltagem devido à libertação de oxigénio pelos discos foliares no intervalo de tempo Δt .

$\Delta 1$ - acréscimo de voltagem devido à injeção de 1 ml de ar no processo de calibração.

Δt - intervalo de tempo correspondente ao acréscimo de voltagem (min).

a - área dos discos foliares.

10^4 - factor de conversão de cm^2 em m^2 .

60 - factor de conversão de minutos em segundos.

Os valores da capacidade fotossintética expressos por peso seco e por unidade de massa de azoto nos tecidos foliares, foram calculados a partir dos valores expressos por

área foliar entrando em consideração com a área foliar específica (SLA) e concentração de azoto das folhas, respectivamente.

3.6. Trocas gasosas nas condições de crescimento

As trocas gasosas entre as folhas e a atmosfera baseiam-se num fluxo de vapor de água que sai da folha e num fluxo de CO_2 que entra. O fluxo de vapor de água corresponde à transpiração (E) e o fluxo de CO_2 à assimilação líquida de CO_2 (A), que é o resultado do balanço entre a fotossíntese e a respiração e a fototranspiração. A medição das trocas gasosas nas condições de crescimento foi realizada com um porómetro de $\text{CO}_2/\text{H}_2\text{O}$ (H. Walz, Efeltrich, Alemanha) descrito por Schulze et al. (1982) e Chaves et al (1987). Este porómetro é constituído essencialmente por três partes:

1) Câmara de medida, onde se introduz a folha para medição das trocas gasosas. Esta câmara tem uma forma cilíndrica e é tapada na parte superior por uma película fina e transparente de polietileno. Possui igualmente uma ventoinha que promove a circulação de ar no seu interior. A cobertura com uma fina película de polietileno permite minimizar o "efeito de estufa" e contribui para que a temperatura dentro da câmara se mantenha próxima da temperatura exterior. A câmara possui ainda sensores para medir a temperatura e a humidade relativa da atmosfera interna e a diferença entre as temperaturas da folha e do ar. No exterior existe também um sensor que mede a radiação incidente.

2) Analisador de gás por infravermelho (IRGA), com dois canais para medição diferencial do CO_2 e do vapor de água. Com o IRGA é possível estimar com rigor a taxa fotossintética aparente em folhas ligadas à planta, assim como a taxa de transpiração e a condutância estomática para o vapor de água. O processo de medição proporcionado pelo IRGA baseia-se no facto de as moléculas de gases heteroatómicos terem de absorver radiação infravermelha, possuindo cada gás um espectro de absorção específico nesta faixa de comprimentos de onda. Com um IRGA, mede-se a densidade de determinado gás através da redução na transmissão da radiação infravermelha que se verifica nos comprimentos de onda de absorção que lhe são característicos. Apesar de o espectro de absorção do CO_2 e do vapor de água se sobreporem parcialmente e o vapor de água estar presente no ar em maior concentração que o CO_2 , a interferência provocada pelo vapor de água é ultrapassada secando o ar através de um "sistema de espelhos de ponte de orvalho", antes da entrada do CO_2 no IRGA.

3) Unidade de controlo e centralização da informação, que integra bombas de circulação de ar e respectivos controladores de fluxo. Antes de entrar no sistema de medida, o ar passa por um recipiente homogeneizador de volume elevado (50 litros) com o objectivo de se reduzir ao mínimo as flutuações de concentração de CO₂ e humidade. Depois, a massa de ar é dividida em duas correntes: uma vai passar num caudalímetro de massa, depois na câmara onde está a folha e finalmente nas células de medida do IRGA. A outra é conduzida para as células de referência do IRGA, passando primeiro por um recipiente com um volume igual ao da câmara, de forma a garantir que o gás que chega às células de medida e de referência entre no sistema ao mesmo tempo. A amostra gasosa, depois de sair do canal do vapor de água e antes de passar pelo canal do CO₂, passa por uma unidade de Peltier, onde se verifica o abaixamento da temperatura do ponto de orvalho até 2°C, induzindo a condensação e remoção do vapor de água. Assim, consegue-se minimizar a interferência do vapor de água nas leituras da concentração do CO₂.

A intervalos de tempo regulares (15 a 30 minutos) devem determinar-se os valores do zero. Estes valores são obtidos quando se faz passar o mesmo ar pela referência e pela câmara sem folha. Tanto os sinais diferenciais do CO₂ e vapor de água recebidos pelo IRGA como os dos sensores, são enviados para a unidade centralizadora de dados, onde é possível fazer a leitura dos respectivos valores. A partir dos valores registados para os caudais molares, temperatura do ar e da folha, humidade do ar e zeros do aparelho para o CO₂ e vapor de água e com base numa versão aperfeiçoada de um programa de computador, calcularam-se: taxa instantânea de fotossíntese (A), condutância estomática para o vapor de água (g_s) e eficiência de uso da água intrínseca (razão A/g_s). Adoptaram-se as unidades propostas por Cowan (1977) e os cálculos foram efectuados de acordo com von Caemmerer e Farquhar (1981):

a) Taxa de fotossíntese aparente (A)

$$A \text{ (mol CO}_2\text{.m}^{-2}\text{.s}^{-1}\text{)} = (u_e/s) * [(1-w_e)/(1-w_0)] * (c_e-c_0) - E * c_e$$

em que,

u_e - caudal molar total do ar que entra na câmara (mol. s⁻¹)

s - área foliar em m²

w_e - fracção molar do vapor de água no ar que entra na câmara (mol.mol⁻¹)

w₀ - fracção molar do vapor de água no ar que sai da câmara (mol.mol⁻¹)

c_e - fracção molar do CO₂ no ar que entra na câmara (mol.mol⁻¹)

c₀ - fracção molar do CO₂ no ar que sai da câmara (mol.mol⁻¹)

E - taxa instantânea de transpiração (mol.m⁻².s⁻¹)

b) Condutância estomática para o vapor de água (g_s)

$$g_s \text{ (mol.m}^{-2}\text{.s}^{-1}\text{)} = E * [1 - (w_i+w_a)/2] / (w_i-w_a)$$

em que,

E - taxa instantânea de transpiração (mol.m⁻².s⁻¹)

w_i - fracção molar do vapor de água nos espaços intercelulares da folha (mol.mol⁻¹)

w_a - fracção molar do vapor de água no ar circundante da folha (mol.mol⁻¹)

4 Efeitos da fertilização azotada no crescimento, distribuição e ciclo interno do N em plantas de *Eucalyptus globulus* Labill.¹

4.1 Introdução

Como ficou escrito no capítulo 2, o N armazenado nos tecidos das árvores pode contribuir significativamente para o seu crescimento. Nas espécies caducifólias, o N é armazenado no inverno nos tecidos lenhosos perenes e remobilizado na primavera quando se inicia o novo crescimento (Millard e Neilsen, 1989; Millard e Proe, 1991). Nas espécies perenifólias as folhas mais velhas podem armazenar N, podendo verificar-se remobilização quando ocorre o crescimento, mesmo sem se observar senescência (Millard e Proe, 1992; Nambiar e Fife, 1987). O ciclo interno do N contribui significativamente para o crescimento das árvores à medida que a idade aumenta (Miller e Miller, 1987). A remobilização do N pode suprir as necessidades desse nutriente quando a disponibilidade de N é reduzida, por exemplo, no início da estação de crescimento, e nesse sentido aumentar a eficiência do uso do N (Birk e Vitousek, 1986).

O Eucalipto (*Eucalyptus globulus* Labill.) é uma espécie de crescimento rápido, cujas folhas apresentam uma longevidade curta em comparação com espécies de crescimento mais lento, em idênticas condições ambientais (Pereira, 1994). A taxa de renovação das folhas é portanto, superior na *E. globulus*. A partição de assimilados para as folhas, e uma expansão rápida da copa são condições necessárias à manutenção de um crescimento rápido. A dinâmica interna do N na copa de *E. globulus* pode desempenhar um papel importante na manutenção de uma população jovem de folhas (com maior capacidade fotossintética) nas camadas exteriores da copa, permitindo uma interceptação eficiente da radiação para a fotossíntese (Pereira, 1994).

O objectivo deste ensaio foi determinar o efeito de dois níveis de fertilização azotada no crescimento, fotossíntese, repartição do N e ciclo interno do N em pequenas plantas de *Eucalyptus globulus* Labill.

¹ Escrito com base em Carvalho et al (1993) e Pereira et al (1994)

4.2. Material vegetal e condições experimentais

Plantas de *Eucalyptus globulus* (30 cm de altura, 4 meses após sementeira) foram mantidas em vasos de 10 litros com areia dentro de uma estufa com temperaturas de 20°C durante o dia e 15°C durante a noite. As plantas foram regadas de dois em dois dias com soluções nutritivas fornecidas às taxas relativas de adição de azoto de 0.12 d⁻¹, ("alto" N) e de 0.04 d⁻¹ ("baixo" N), de acordo com a fórmula exponencial:

$$N = N_0 * (\exp(RAR * t)^{-1})$$

em que N = quantidade de nutriente fornecido, N₀ = teor inicial de N nas plantas (7,7 mg.planta⁻¹); RAR = taxa relativa de adição (d⁻¹), t = momento de aplicação do nutriente (dia) (Ingestad e Lund, 1979).

Os restantes nutrientes minerais foram fornecidos em proporções fixas relativamente à massa de N presente nas soluções, segundo Ericsson (1989): K(64); P(13); S(8); Mg(9); Ca(9); Mn(0.4); Zn(0.03); Cu(0.03); B(0.2); Fe(0.7). As soluções nutritivas continham azoto na forma ¹⁵NH₄¹⁵NO₃ marcado com ¹⁵N (enriquecimento de 4%).

Procedeu-se à análise de crescimento através de amostragens periódicas de 5 plantas por tratamento (nível de fertilização). As plantas foram removidas dos vasos em intervalos de 9 dias entre amostragens e separadas em folhas novas (folhas desenvolvidas após o período de aplicação do ¹⁵N); extensão do caule; folhas velhas e caule velho (pré-existentes em relação ao início da aplicação do ¹⁵N) e raízes. Determinaram-se os pesos secos de todas as componentes de biomassa, a área foliar e o número de folhas de cada planta. Na véspera de cada amostragem procedeu-se também à determinação da taxa de fotossíntese e capacidade fotossintética em 5 folhas novas completamente expandidas por tratamento. As concentrações de N total e de ¹⁵N nas amostras foram determinadas por espectrometria de massa (ANA-SIRA) no MLURI, em Aberdeen. O enriquecimento dos tecidos com ¹⁵N foi utilizado para calcular o N das plantas proveniente da absorção directa pelas raízes durante o período de aplicação do ¹⁵N, tal como se encontra descrito em Millard e Neilsen (1989) (ver também o capítulo 3).

A taxa líquida de fotossíntese e a capacidade fotossintética foram medidas utilizando os métodos descritos no capítulo 3.

4.3. Resultados

A figura 4.1 mostra o aumento da biomassa total das plantas para os dois níveis de fertilização. As taxas relativas de crescimento (RGR) estimadas a partir do ajustamento do modelo exponencial aos dados foram 0,043 para as plantas "alto" N e 0,023 para as plantas "baixo" N.

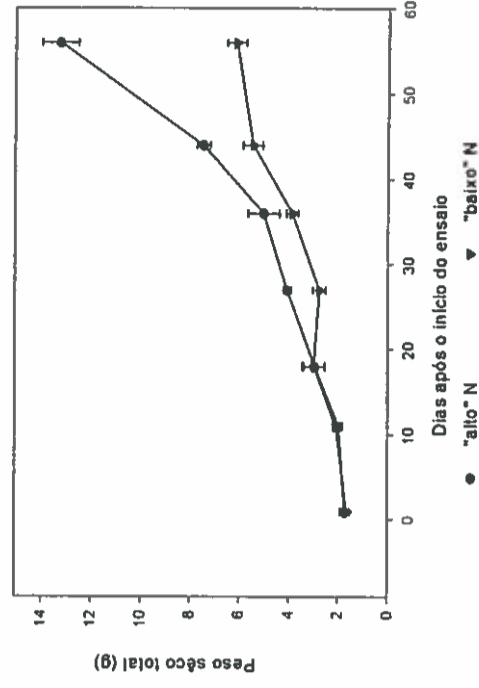


Figura 4.1. Efeito do fornecimento de dois níveis de fertilização azotada sobre o crescimento de plantas de *E. globulus*.

Verificou-se uma relação estreita entre o crescimento das plantas considerado na sua totalidade e o aumento do peso seco das folhas (figura 4.2) e do seu número (figura 4.3) durante o ensaio. O aumento relativo da área foliar por unidade de acréscimo de peso seco (Potter e Jones, 1977) cerca de um mês após o início do ensaio foi de 135 cm².g⁻¹ nas plantas "alto" N e 91 cm².g⁻¹ nas plantas "baixo" N.

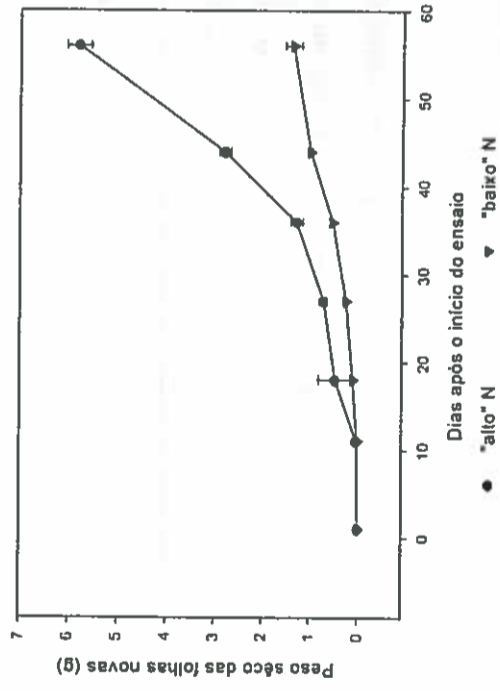


Figura 4.2. Efeito do fornecimento de dois níveis de fertilização azotada sobre o peso seco das folhas novas de plantas de *E. globulus*.

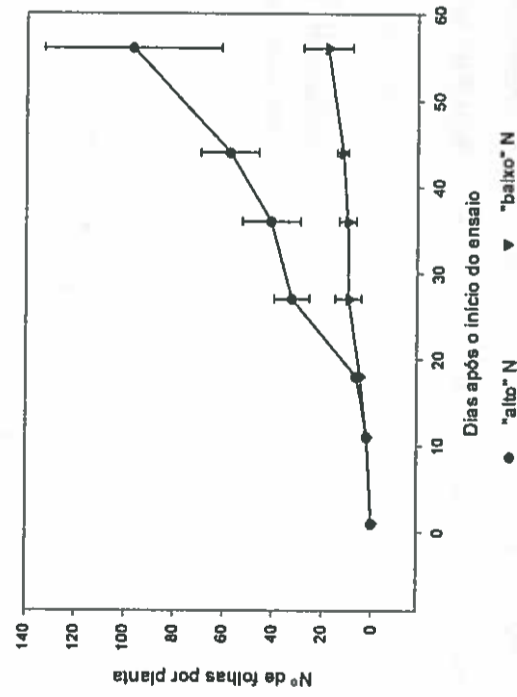


Figura 4.3. Efeito do fornecimento de dois níveis de fertilização azotada sobre o número de folhas por planta de *E. globulus*.

O quadro 4.1 mostra o efeito do fornecimento de N sobre a distribuição de peso seco nas plantas no final do ensaio. As folhas novas representam 44% do peso seco total das plantas "alto" N e 22% das plantas "baixo" N. O peso das folhas velhas aumentou de 0,7g para 1,6g por planta em ambos os grupos de plantas, representando 12% do peso

sêco total das plantas "alto" N e 27% das plantas "baixo" N. A proporção da biomassa total representada pelas raízes nas plantas "alto" N foi aproximadamente metade (17%) das plantas "baixo" N (30%). No entanto, o crescimento das raízes em ambos os grupos de plantas não foi significativamente diferente, resultando num decréscimo significativo ($p < 0,05$) da razão raiz-parte aérea nas plantas "alto" N um mês após o início do ensaio (figura 4.4).

Quadro 4.1. Efeito do fornecimento de N na distribuição do peso sêco no final do ensaio

	"alto" N	"baixo" N
Folhas novas	0,43 ± 0,019	0,21 ± 0,046
Caulo novo	0,11 ± 0,019	0,04 ± 0,007
Folhas velhas	0,12 ± 0,017	0,27 ± 0,038
Caulo velho	0,15 ± 0,025	0,17 ± 0,019
Raízes	0,17 ± 0,023	0,30 ± 0,031

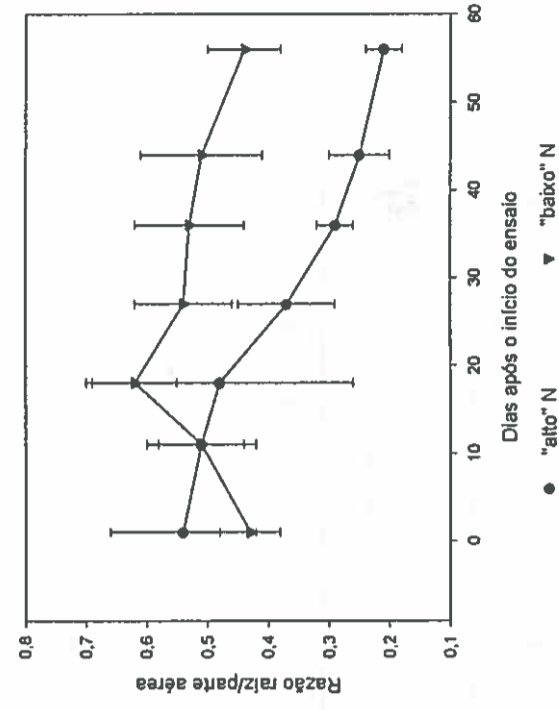


Figura 4.4. Efeito do fornecimento de dois níveis de fertilização azotada sobre a razão raiz/parte aérea em plantas de *E. globulus*.

Como se pode verificar no quadro 4.2, a concentração de N considerando toda a planta atingiu 3,5% do peso sêco no final do ensaio nas plantas "alto" N enquanto nas

plantas "baixo" N a concentração foi muito mais baixa (1,1%) na mesma ocasião. As concentrações foram relativamente constantes ao longo do ensaio, excepto nas raízes em que se verificou um aumento na última amostragem. Nas plantas "baixo" N as concentrações de N das folhas diminuíram na última amostragem, verificando-se assim um efeito de diluição de N nos tecidos foliares. A concentração de N nas raízes das plantas "baixo" N manteve-se constante ao longo do ensaio, não se verificando efeito de diluição. Em ambos os tratamentos as folhas novas são sempre mais ricas em N do que as folhas velhas.

Como se vê no quadro 4.3, as taxas elevadas de crescimento das plantas "alto" N não são só devidas a diferenças na repartição da biomassa mas também a um aumento da concentração de N nas folhas (um aumento de aproximadamente 2.5 vezes no final do ensaio). Estas concentrações elevadas de N nos tecidos foliares estão positivamente

Quadro 4.2. Concentrações de N das plantas completas, das folhas e das raízes (mg.g^{-1}) ao longo do ensaio em plantas de *E. globulus* sujeitas a duas taxas de fertilização azotada. Os valores são as médias e os desvios padrões.

	Dias após o início do ensaio			
	1	19	37	57
"alto" N				
Planta completa	12.6 ± 1.87	23.1 ± 5.68	30.4 ± 0.76	35.4 ± 1.89
Folhas Novas		51.3 ± 3.82	55.3 ± 2.81	48.6 ± 3.95
Folhas Velhas	20.7 ± 4.08	28.9 ± 1.15	31.1 ± 2.33	28.6 ± 3.41
Raízes	8.6 ± 0.70	11.6 ± 1.92	16.1 ± 1.27	34.1 ± 4.15
"baixo" N				
Planta completa	13.5 ± 1.59	14.0 ± 2.55	14.2 ± 1.49	10.9 ± 1.03
Folhas Novas		32.9 ± 6.70	30.1 ± 1.34	16.1 ± 2.50
Folhas Velhas	21.1 ± 2.91	20.7 ± 4.08	19.5 ± 1.14	12.4 ± 1.50
Raízes	9.1 ± 1.52	8.5 ± 1.10	8.6 ± 1.21	9.5 ± 1.26

relacionadas com taxas líquidas de fotossíntese significativamente mais elevadas (1.4 vezes) e valores de capacidade fotossintética também mais elevados (dobro) (Quadro 4.3). A abertura estomática não foi afectada e portanto a eficiência do uso da água (WUE) aumentou significativamente com o aumento da concentração de N nos tecidos.

Quadro 4.3. Trocas gasosas (A , $\mu\text{mol. m}^{-2} \text{s}^{-1}$; g_s , $\text{mmol. m}^{-2} \text{s}^{-1}$), capacidade fotossintética ($\mu\text{mol O}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e eficiência do uso da água (WUE) ($\text{mmol CO}_2 / \text{mol H}_2\text{O}$) em *E. globulus* sujeitos a dois níveis de fertilização azotada (concentração de N nas folhas, mg N.g^{-1}).

Tratamentos	A	g_s	Capac. fot.	WUE
"alto" N (48.6 ± 3.3)	21.5 ± 0.9	187.1 ± 22.5	42.5 ± 4.4	9.3 ± 1.5
"baixo" N (16.1 ± 2.5)	14.9 ± 0.8	203.6 ± 27.9	24.1 ± 4.2	6.1 ± 1.1

A distribuição percentual do N total nas diferentes partes das plantas no final do ensaio (quadro 4.4) mostra um padrão semelhante ao verificado na distribuição de peso seco (quadro 4.1). A maior parte do N das plantas "alto" N encontra-se nas folhas novas (60%) embora estas representem somente 43% do peso seco total. Isto significa que as folhas novas das plantas de "alto" N acumularam N nos seus tecidos (ver quadro 4.2). No final do ensaio a percentagem de N das folhas velhas das plantas de "baixo" N era ainda idêntica à das a folhas novas (ca. 30%).

Quadro 4.4. Efeito do fornecimento de N na proporção do N total nas diferentes componentes da biomassa das plantas no final do ensaio.

	"alto" N	"baixo" N
Folhas Novas	0.60 ± 0.020	0.33 ± 0.051
Caulo Novo	0.09 ± 0.015	0.04 ± 0.009
Folhas Velhas	0.10 ± 0.014	0.31 ± 0.038
Caulo Velho	0.05 ± 0.007	0.06 ± 0.003
Raízes	0.17 ± 0.020	0.26 ± 0.034

A quantificação do ^{15}N no novo crescimento das plantas de *E. globulus* durante o ensaio permitiu quantificar directamente a fracção do N total resultante da absorção directa pelas raízes e distinguir indirectamente o N retranslocado para as novas partes das plantas. Assim todo o N não marcado foi remobilizado a partir de tecidos presentes antes do início do ensaio. Determinou-se a distribuição do N não marcado nas plantas em cada uma das amostragens e expressou-se para cada componente de biomassa como uma proporção do N total não marcado (quadro 4.5).

Quadro 4.5 Efeito do fornecimento de N na proporção do N não marcado total recuperado nas diferentes componentes da biomassa durante o ensaio. Os valores são a média e desvio padrão entre parêntesis.

		Dias após o início do ensaio						
		1	12	19	28	37	45	57
"alto" N								
Folhas Novas	0		0.02 (0.03)	0.26 (0.05)	0.17 (0.04)	0.25 (0.04)	0.36 (0.04)	0.43 (0.02)
Folhas Velhas	0.65 (0.06)		0.66 (0.05)	0.50 (0.15)	0.57 (0.04)	0.49 (0.05)	0.37 (0.04)	0.28 (0.02)
Raízes	0.23 (0.05)		0.20 (0.03)	0.16 (0.06)	0.17 (0.03)	0.15 (0.02)	0.16 (0.04)	0.16 (0.01)
"baixo" N								
Folhas Novas	0		0.01 (0.01)	0.06 (0.03)	0.15 (0.06)	0.23 (0.03)	0.26 (0.07)	0.27 (0.06)
Folhas Velhas	0.68 (0.03)		0.67 (0.02)	0.61 (0.05)	0.54 (0.04)	0.49 (0.02)	0.37 (0.07)	0.43 (0.05)
Raízes	0.20 (0.03)		0.21 (0.02)	0.21 (0.03)	0.22 (0.03)	0.20 (0.02)	0.25 (0.03)	0.20 (0.03)

Como se pode constatar ocorreu translocação de N a partir das folhas velhas mas não há evidência de remobilização de N a partir das raízes. Estes resultados contrastam com observações feitas noutras espécies de folhosas que evidenciam armazenamento da maior parte do N remobilizado durante a primavera nas raízes.

Verificou-se remobilização de N a partir das folhas velhas durante o ensaio nas plantas de "alto" N. Em contrapartida o N não marcado nas folhas de plantas "baixo" N só aumentou após 45 dias. O N não marcado (i.e. N presente nas plantas antes do início do ensaio) representava cerca de 10% do N total presente nas folhas novas na última amostragem (quadro 4.6). Pelo contrário, as plantas "baixo" N não evidenciaram qualquer aumento de N não marcado entre as duas últimas amostragens. No entanto o N não marcado representava cerca de 48% do N total nas folhas novas na última amostragem.

Quadro 4.6 Quantidades de N total (i.e. marcado e não marcado) (mg. planta^{-1}) e as proporções de N não marcado em relação ao N total nas folhas de plantas de *E. globulus* desenvolvidas em estufa com duas taxas de fornecimento de N. Os valores são a média e desvio padrão.

		N total		% N não marcado
		"alto" N	"baixo" N	
Folhas Novas		287.5 ± 47.5		0.10 ± 0.005
Folhas Velhas		46.1 ± 8.8		0.42 ± 0.04
Folhas Novas		21.8 ± 4.0		0.47 ± 0.05
Folhas Velhas		20.0 ± 2.9		0.81 ± 0.03

A eficiência do uso do azoto (NUE) foi calculada dividindo a biomassa produzida num determinado período pelo N absorvido nesse mesmo período. Nas plantas de "alto" N a NUE foi de 25.4 g.g(N)^{-1} , enquanto nas plantas de "baixo" N a NUE subiu para $100.5 \text{ g.g(N)}^{-1}$, durante o ensaio. A taxa de assimilação de carbono por unidade de N das folhas era significativamente mais alta nas plantas de "baixo" N (quadro 4.7). As diferenças na NUE resultam das diferenças na PNUe (fotossíntese por unidade de massa de N). No entanto, para além da PNUe mais elevada, as plantas de "baixo" N acumularam menos N em tecidos não foliares do que as plantas de "alto" N. As concentrações das últimas foram 3.6 e 2.3 vezes mais elevadas respectivamente nas raízes e caule produzidos durante o ensaio. Isto contribuiu igualmente para uma NUE mais elevada nas plantas de "baixo" N.

Quadro 4.7 Efeito do fornecimento de N na eficiência fotossintética do uso do azoto (PNUe) ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ N.s}^{-1}$) em *E. globulus* durante o ensaio. Os valores são as médias e desvios padrão.

		Dias após o início do ensaio	
		19	37
"alto" N		9.1 ± 3.4	12.6 ± 1.9
"baixo" N		11.1 ± 1.4	14.0 ± 2.1

4.4. Discussão

A produção de biomassa está positivamente relacionada com o fornecimento de N. Valores mais altos da taxa de fotossíntese e da área foliar das plantas de "alto" N contribuíram para maiores taxas de crescimento destas plantas (Patterson et al., 1978; Potter e Jones, 1977). Em primeiro lugar, isto resultou sobretudo de um aumento da proporção de folhas novas no peso seco total das plantas, acompanhado de um aumento da área das folhas novas que permitiu maior interceptação da luz nas plantas de "alto" N. Verificou-se o mesmo fenómeno em *E. globulus* em condições de campo (Pereira et al., 1989). As plantas de "alto" N apresentaram também um número de folhas por planta e uma área foliar específica superiores. Uma elevada área foliar específica está relacionada com produtividades mais elevadas pois permite uma exposição à luz de uma maior área foliar por unidade de biomassa de tecidos estruturais das folhas (Evans, 1989).

É sabido que a taxa de fotossíntese aumenta quando aumenta a concentração de N nos tecidos, nomeadamente quando a partição do N se faz em benefício das enzimas responsáveis pela assimilação do carbono (Evans, 1989; Ryle et al. 1992). Verificou-se um aumento significativo do teor de N das plantas de "alto" N, especialmente nas folhas novas. A concentração de N considerando o peso seco de toda a planta como referência atingiu 3.5% no final do ensaio enquanto nas plantas de "baixo" N ela foi somente de 1.1%. Os valores da concentração de N nas folhas novas das plantas de "alto" N foram muito mais elevadas do que as encontradas nos níveis superiores da copa de árvores fertilizadas e regadas em ensaios de campo (2x) (Pereira et al., 1989). A este aumento da concentração de N nas folhas novas das plantas de "alto" N está associado um aumento das taxas de fotossíntese em comparação com as plantas de "baixo" N (Pereira et al., 1992). A abertura estomática não foi afectada, resultando numa eficiência do uso da água maior nas plantas com maior concentração de N nos seus tecidos.

A proporção da biomassa total nas raízes das plantas de "alto" N foi aproximadamente metade da verificada nas plantas de "baixo" N. No entanto, o crescimento das raízes não foi significativamente diferente entre tratamentos. Daqui resultaram menores valores da razão raiz/parte aérea nas plantas de "alto" N. O decréscimo da razão raiz/parte aérea com fornecimentos elevados de N é uma resposta comum observada noutras espécies de eucalipto (Cromer e Jarvis, 1990; Linder e Rook,

1984). No entanto, Sheriff e Nambiar (1991) registaram uma repartição constante do peso seco entre raízes e parte aérea com diferentes fornecimentos de N em *E. globulus*.

A quantificação do N marcado com ^{15}N nos tecidos novos permitiu estimar directamente a importância do N absorvido pelas raízes durante o ensaio. Ao N não marcado corresponde a fracção remobilizada.

A translocação de N para as folhas novas partiu sobretudo das folhas velhas e não das raízes, como se constatou na caducifolia *Acer pseudoplatanus* (Millard e Proe, 1991). No entanto, estas diferenças podem ser devidas: (1) ao ensaio ter sido concebido para um período curto, de forma que somente a remobilização corrente foi estudada e não a reciclagem de N entre duas estações de crescimento e (2) ao facto de a *E. globulus* ser uma espécie perenifolia. Nestas espécies já se verificou que a origem predominante do N remobilizado para as folhas novas são as folhas mais antigas (ver, por exemplo, Millard e Proe, 1992).

Os dados que demonstram a remobilização de N das folhas mais antigas para as folhas mais novas sustentam a hipótese de que o N é distribuído nas copas para otimizar a assimilação do carbono da planta no seu conjunto. De facto, observações de que a concentração de N das folhas da periferia da copa (mais iluminadas) é superior reflecte a relação entre ambiente luminoso e concentração de N nas copas que poderá estar subjacente à optimização da fotossíntese para o crescimento da planta considerada no seu conjunto (DeJong, Day e Johnson, 1989) (ver capítulo 2).

Apesar de um acréscimo no crescimento das plantas e das taxas de fotossíntese mais elevadas, os níveis elevados de fertilização azotada resultaram numa acumulação de N nas folhas novas e numa queda importante dos valores de eficiência do uso do azoto (NUE) das plantas de "alto" N quando comparadas com as plantas de "baixo" N.

Os valores de NUE encontrados são comparáveis aos de outras espécies em condições experimentais semelhantes (por exemplo, *Acer pseudoplatanus*, Millard e Proe, 1991). O grande aumento da NUE nas plantas de "baixo" N pode ser explicado em parte como uma consequência da remobilização de N já existente nas plantas. De facto, o ciclo interno do N revelou-se relativamente mais importante nas plantas de "baixo" N do que nas plantas de "alto" N. Além disso, a taxa de fotossíntese por unidade de massa de N das folhas foi consideravelmente mais alta nas plantas de "baixo" N relativamente às de "alto" N. Para além da melhor "eficiência do uso fotossintético do N" (fotossíntese por unidade de massa de N) as plantas de "baixo" N acumularam simultaneamente menos N nos tecidos não-fotossintéticos do que as plantas de "alto" N. Pode admitir-se

que as plantas de "alto" N funcionam como os níveis superiores das copas das árvores (mais iluminadas) respondendo a um período de alta disponibilidade de nutrientes (incluindo o azoto), por exemplo, na primavera, acumulando nutrientes na copa para uma remobilização posterior na copa (Chapin et al. 1990). A importância da mobilização de N acumulado para o crescimento das plantas e a melhor NUE tem sido demonstrada em muitos casos e foi clara nas plantas de *E.globulus* que reciclaram quantidades substanciais de N para o crescimento de folhas novas.

Em condições de campo não se encontraram grandes diferenças entre as NUE de árvores de *E.globulus* fertilizadas com diferentes níveis de nutrientes (Pereira et al., 1992a; 1992b; Tomé e Pereira, 1991). Aos fornecimentos mais elevados de nutrientes corresponderam aumentos substanciais da área foliar e da interceptação da luz pelas copas. No entanto, contrariamente aos resultados destes ensaios não se detectaram grandes diferenças nas concentrações de N das folhas (Tomé e Pereira, 1991) tendo resultado em pequenas diferenças de NUE independentes do fornecimento de nutrientes. Outro factor importante foi a interacção da nutrição mineral com a disponibilidade de água, uma vez que plantas irrigadas durante o Verão tiveram os valores mais altos de NUE, independentemente da disponibilidade de nutrientes (Pereira et al., 1992a).

5 Importância da remobilização de N no crescimento da parte aérea em plantas de *Eucalyptus globulus* Labill.¹

5.1. Introdução

O armazenamento e remobilização do azoto (N) a partir das folhas pode contribuir com uma parte importante do N utilizado no crescimento das coníferas (Rapp et al., 1979, Nambiar e Fife, 1991, Millard e Proc, 1993). Contrastando com as espécies de folha caduca, a remobilização do N a partir das agulhas das coníferas de folha persistente pode ocorrer independentemente da senescência das folhas (Nambiar e Fife, 1987, Nebel e Matile, 1992, Crane e Banks, 1992, Greenway et al., 1992) estando relacionada com o crescimento da parte aérea (Nambiar e Fife, 1991). Por outro lado, verificou-se em estudos de campo, baseados no balanço de N, que o melhoramento da fertilidade da estação aumenta a capacidade para o armazenamento de nutrientes, nomeadamente através do aumento da massa foliar (Nambiar e Fife, 1987, Helmsaari, 1992).

Durante a senescência da copa de algumas espécies de folha caduca, uma grande parte do azoto remobilizado é proveniente da proteína fotossintética ribulose-bifosfato carboxilase/oxigenase (Rubisco) (Kang e Titus 1980, Millard e Thomson 1989). A Rubisco é uma proteína de armazenamento de N em muitas espécies de plantas (Huffaker e Miller, 1978, Millard, 1988, Ekman et al. 1989). As formas de N armazenadas e remobilizadas nas folhas independentemente da ocorrência de senescência são menos conhecidas. Camm (1993) mediu uma diminuição de Rubisco e de proteínas ligadas à clorofila em agulhas de 1 ano de plantas de *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco durante o crescimento das agulhas do ano seguinte. Camm (1993) também mediu um declínio na capacidade fotossintética das agulhas, sugerindo que o aparelho fotossintético das folhas maduras pode servir como origem de nutrientes para o desenvolvimento das folhas novas.

¹ Escrito com base em Wendler et al (1995)

Contrastando com as coníferas das zonas temperadas, pouco se sabe sobre os processos de armazenamento e remobilização de N em *Eucalyptus*. Leuning (1991), a partir de observações das concentrações de N nas folhas, que se verifica retranslocação de N das folhas velhas para as novas em árvores novas de *E. grandis* W. Hill ex Maiden. Padrões similares de retranslocação foram registados em ensaios de campo com *E. globulus* Labill. (Pereira et al. 1989) e em plantas da mesma espécie criadas em vasos com areia (Carvalho et al. 1993), embora a contribuição do ciclo interno do N para o crescimento não seja conhecida.

Plantas de *E. globulus* Labill. foram mantidas em vasos com areia e fertilizadas com quantidades contrastantes de N ("alto" e "baixo"), quando o crescimento se iniciou na Primavera, para determinar se (1) as folhas velhas fornecem N às folhas em desenvolvimento, (2) a Rubisco actua como uma forma de proteína de armazenamento nas folhas velhas, e (3) o fornecimento de N afecta a remobilização deste nutriente das folhas velhas para as folhas novas.

5.2. Material e métodos. Delineamento experimental

Procedeu-se à colocação de plantas de *E. globulus* Labill. com 6 meses em vasos de 10 litros cheios de areia. As plantas foram colocadas ao ar livre até Janeiro (temperaturas médias a variar entre 15 e 10°C), embora protegidas da chuva. Os vasos foram regados de dois em dois dias com uma solução nutritiva (descrição em Millard e Proe, 1991) contendo 6,0 mol N m⁻³ na forma NH₄NO₃. No final de Janeiro, as plantas foram transferidas para vasos com areia lavada e colocadas numa estufa com ambiente controlado (temperaturas dia/noite de 22/15°C). As plantas foram organizadas em blocos casualizados e regadas com soluções nutritivas contendo 6,0 mol N m⁻³ ("alto" N) e 1,0 mol N m⁻³ ("baixo" N) na forma NH₄NO₃.

Métodos e procedimentos

Procedeu-se à análise de crescimento através de sete amostragens de seis plantas por tratamento entre final de Novembro e final de Março. As plantas foram separadas em folhas novas (folhas desenvolvidas após meados de Fevereiro), folhas velhas, caule e raízes. Mediram-se os pesos secos de todas as componentes, a área foliar e o número de folhas por planta. Retiraram-se discos frescos das folhas novas e velhas de cada planta amostrada, e determinaram-se os seus pesos e áreas. Metade dos discos foliares foram imediatamente congelados em N₂ líquido e guardados a uma temperatura de -

80°C para análise posterior de clorofila. A capacidade fotossintética foi medida nos discos frescos com eléctrodo de oxigénio (Delieu e Walker, 1981) em condições de saturação de CO₂ (concentração de 5%) e de luz (PPFD de 1200 µmol m⁻² s⁻¹), e temperatura da folha de 25°C. Após as leituras da capacidade fotossintética, os discos foram colocados em N₂ líquido e guardados a uma temperatura de -80°C para análise de Rubisco e proteína solúvel. O teor de N foi determinado com um analisador de C/H/N (Carlo Erba Strumentazi, Milan, Itália). O teor de clorofila das folhas foi determinado por espectrofotometria após extracção com acetona (Bruinsma, 1961). Para determinar a concentração de Rubisco das folhas, utilizaram-se extractos dos discos (área total 2,5 cm²) das folhas em N₂ líquido com 200 mg de polivinilpirrolidona (PVPP) e 2 cm³ de tamponizador da extracção HEPES a 50 mol.m⁻³ (pH 7,4), contendo 5 mol.m⁻³ MgCl₂, 1 mol.m⁻³ de ácido etilendiamina tetracético (EDTA), 1 mol.m⁻³ de ácido etileno glicol-bis (β-aminoetil éter) N,N,N',N'- tetracético, 10% glicerol, 20 mol.m⁻³ de 1,4-ditiotreitol, 3 mol.m⁻³ de benzamida, 2 mol.m⁻³ de ácido amino-capróico, e 40 mmol.m⁻³ de fenil metil sulfonil fluoreto, após o que se procedeu à centrifugação durante 2 minutos. A concentração de Rubisco nos extractos das folhas foi determinada por um método ELISA utilizando anticorpos policlonais para a Rubisco (Catt e Millard, 1988). A proteína solúvel total das folhas foi analisada nas mesmas amostras utilizadas na determinação da Rubisco, por um ensaio de proteínas Biorad, baseado num método de Bradford (1976).

5.3. Resultados

5.3.1 Precondicionamento das plantas

Durante o período de Novembro a Janeiro, as plantas foram fertilizadas com quantidades altas de N de forma a aumentar a quantidade de N armazenado. Durante este período, as plantas cresceram lentamente (quadro 5.1), limitadas pela temperatura ambiente. Somente as raízes cresceram de modo significativo durante este período. Embora o crescimento fosse reduzido, verificou-se incorporação de N nas plantas (quadro 5.1). Esta consistiu em 55 mg de N por planta e o teor de N aumentou em todas as componentes entre Novembro e Janeiro. As folhas continham cerca de 50% do N total das plantas, tendo as concentrações de N aumentado de 7 para 27 mg N g⁻¹ no mesmo período.

Quadro 5.1. Peso seco (g planta⁻¹) e teor de N (mg planta⁻¹) de folhas, raízes e caules em Novembro e Janeiro. Os valores são médias ± erro padrão de seis repetições.

Órgão	Peso seco	Teor de N
<i>Novembro</i>		
Folhas	1,0 ± 0,1	7 ± 0,7
caules	0,9 ± 0,1	3 ± 0,3
Raízes	0,7 ± 0,1	4 ± 0,3
Total	2,5 ± 0,2	14 ± 1,2
<i>Janeiro</i>		
Folhas	1,2 ± 0,1	33 ± 4,2
caules	1,1 ± 0,2	13 ± 2,0
Raízes	1,4 ± 0,2	22 ± 2,9
Total	3,7 ± 0,4	68 ± 8,1

As concentrações de Rubisco e de clorofila aumentaram em Dezembro e Janeiro (quadro 5.2). As quantidades de Rubisco calculadas por planta foram 11 ± 4 em Novembro e 38 ± 3 mg em Dezembro. As quantidades de clorofila foram 4 ± 1 e 10 ± 2 mg planta⁻¹, respectivamente. No entanto, a capacidade fotossintética medida em condições de saturação de luz e CO₂ manteve-se constante no mesmo período, resultando num decréscimo significativo da eficiência potencial fotossintética de uso do azoto (PPNUE), calculada como a evolução de O₂ num período de tempo determinado, por unidade de massa de N (quadro 5.2).

5.3.2 Crescimento na Primavera

Em Janeiro, as plantas foram transferidas para uma estufa e o crescimento aumentou após Fevereiro (figura 5.1). Os pesos secos totais foram semelhantes em todas as plantas até Março, quando se verificou um aumento significativo do peso seco das plantas “alto N” comparativamente às plantas “baixo N” (figura 5.1), devido ao rápido crescimento das folhas no primeiro grupo de plantas (figura 5.2).

Quadro 5.2. Características bioquímicas e das trocas gasosas das folhas medidas no início do ensaio e aquando da transferência das plantas para a estufa. Os valores são média ± erro padrão de seis repetições.

Característica	Novembro	Janeiro
Concentração de N (mg g ⁻¹)	7 ± 0,4	27 ± 0,7
Capacidade fotossintética (μmol O ₂ m ⁻² s ⁻¹)	20 ± 0,7	21 ± 0,7
PPNUE (nmol O ₂ mg ⁻¹ N s ⁻¹)	32 ± 2	10 ± 1
Rubisco (mg m ⁻²)	896 ± 280	2870 ± 506
Clorofila (mg m ⁻²)	374 ± 29	680 ± 42

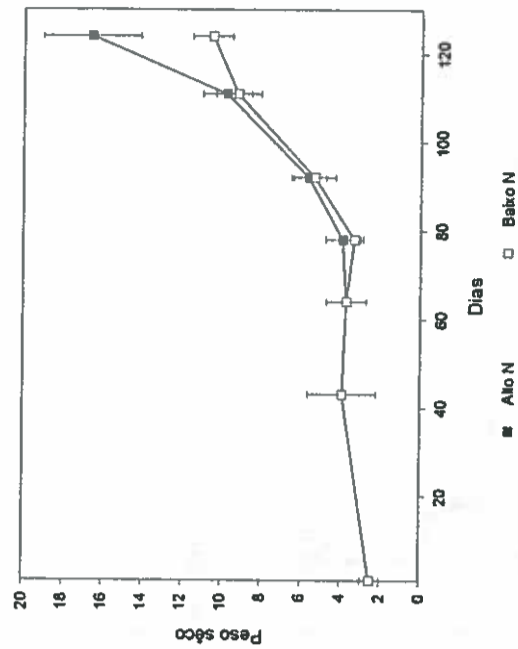


Figura 5.1. Efeito da fertilização com N no peso seco total das plantas ao longo do ensaio. Os valores são a média e erro padrão de seis repetições.

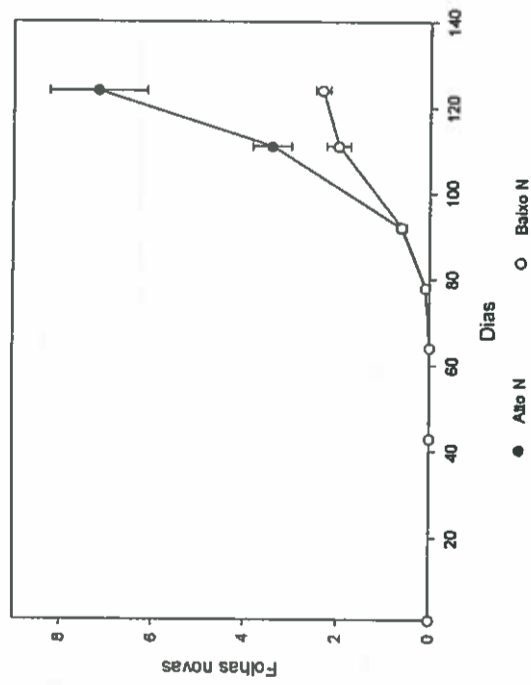


Figura 5.2. Efeito da fertilização com N no peso seco das folhas novas ao longo do ensaio. Os valores são a média e erro padrão de seis repetições.

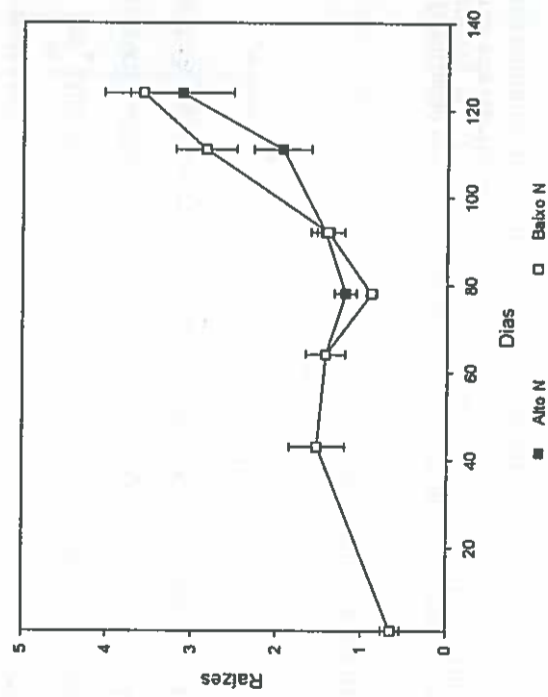


Figura 5.3. Efeito da fertilização com N no peso seco das raízes ao longo do ensaio. Os valores são a média e erro padrão de seis repetições.

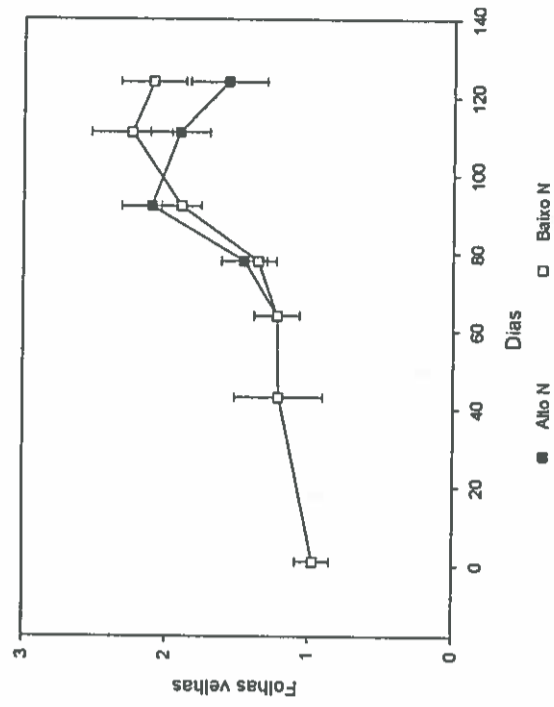


Figura 5.4. Efeito da fertilização com N no peso seco das folhas velhas ao longo do ensaio. Os valores são a média e erro padrão de seis repetições.

O crescimento das raízes não foi significativamente afectado pela fertilização com azoto (figura 5.3), verificando-se um decréscimo da razão raiz/parte aérea (de 0,63 para 0,23), durante os últimos 30 dias do ensaio, nas plantas que receberam "alto" N. Entre Fevereiro e Março não se verificou aumento do peso seco das folhas velhas, tendo o seu número estabilizado (figura 5.4).

5.3.3 Azoto utilizado para o crescimento durante a Primavera

Na Primavera, a absorção de N aumentou em ambos os grupos de plantas, sendo muito superior nas plantas "alto" N (figura 5.5). No final do ensaio, o teor de N dos caules, raízes e folhas novas era superior nas plantas "alto" N ($P < 0,05$ para o caule e raízes, $P < 0,001$ para as folhas novas, quadro 5.3).

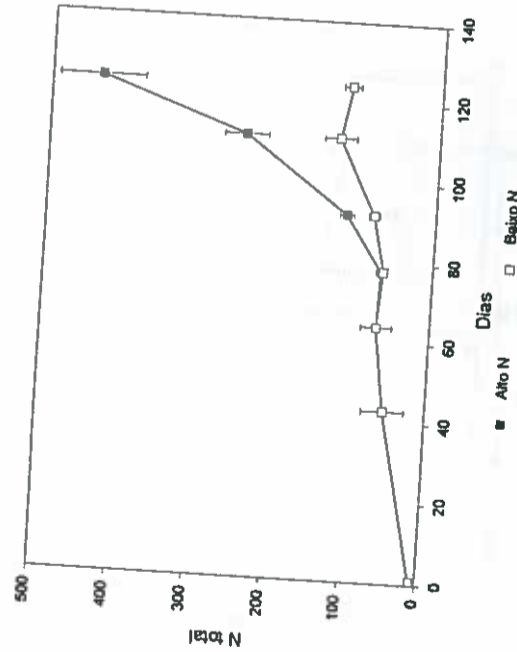


Figura 5.5. Efeito da fertilização com azoto na quantidade total de N das plantas. Os valores (mg planta⁻¹) são a média \pm erro padrão de seis repetições.

Quadro 5.3. Efeito da fertilização com azoto na quantidade de N das plantas no período de meados de Fevereiro a final de Março. Os valores (mg planta⁻¹) são a média \pm erro padrão de seis repetições.

Órgão	Fev. 13	Fev. 27	Mar. 18	Mar. 31
"Alto" N				
Folhas Novas				
Folhas velhas	42 \pm 4,5	30 \pm 0,4	134 \pm 14,2	279 \pm 31,9
Caulo	9 \pm 1,0	54 \pm 5,9	44 \pm 4,4	31 \pm 5,2
Raízes	15 \pm 1,4	11 \pm 1,1	29 \pm 3,4	71 \pm 8,0
		19 \pm 1,3	41 \pm 6,3	55 \pm 9,1
"Baixo" N				
Folhas Novas				
Folhas velhas	43 \pm 2,8	20 \pm 2,6	41 \pm 4,7	37 \pm 3,0
Caulo	8 \pm 0,7	37 \pm 2,5	25 \pm 5,4	25 \pm 2,3
Raízes	12 \pm 1,1	8 \pm 0,5	19 \pm 5,3	22 \pm 2,2
		14 \pm 1,3	42 \pm 5,0	31 \pm 2,8

O teor de N das folhas velhas decresceu ($P < 0,05$) tanto nas plantas "alto" N como nas "baixo" N durante o período de crescimento das folhas. A quantidade de N nas folhas novas foi superior nas plantas "alto" N (quadro 5.3). Nestas plantas, a perda máxima de N das folhas velhas entre final de Fevereiro e final de Março foi pequeno

(cerca de 8%) em relação ao N presente nas folhas novas. Nas plantas "baixo" N, no entanto, o N remobilizado a partir das folhas velhas entre meados de Fevereiro e meados de Março foi suficiente para fornecer aproximadamente 44% do N utilizado no crescimento das folhas novas. A perda de N por parte das folhas velhas representou 43 e 42% do seu teor máximo nas plantas "alto" N (final de Fevereiro) e "baixo" N (meados de Fevereiro), respectivamente.

O teor de Rubisco das folhas velhas aumentou significativamente ($P < 0,01$) nas plantas "alto" N e permaneceu constante nas plantas "baixo" N durante o crescimento das folhas (quadro 5.4). No entanto, o teor de proteína solúvel decresceu nas folhas velhas das plantas "baixo" N ($P < 0,05$) e permaneceu constante nas folhas velhas das plantas "alto" N. Consequentemente, a razão Rubisco/proteína solúvel total aumentou nas folhas velhas de ambos os grupos de plantas, durante o crescimento das folhas novas. Tanto o teor de clorofila como a capacidade fotossintética das folhas velhas permaneceram constantes durante o mesmo período (quadro 5.4), indicando que não houve remobilização de N a partir da Rubisco ou outros componentes do aparelho fotossintético. O N foi portanto remobilizado a partir de proteínas solúveis não identificadas.

5.4. Discussão

Durante o período de Inverno, quando todas as plantas foram fertilizadas com quantidades altas de N, ocorreu incorporação de N nas plantas, tendo aumentado o seu teor e concentração nas folhas e caules. No final deste período a maior parte do N acumulado nas plantas encontrava-se nos tecidos das folhas. As concentrações foliares eram mais elevadas do que as medidas por Pereira et al. (1989) em plantas mais velhas no campo, e comparáveis às concentrações mais altas registadas por Sheriff and Nambiar (1991) e Carvalho et al. (1993) em plantas criadas em vasos sob condições controladas.

Os aumentos nas quantidades de Rubisco e de clorofila estão ligados ao aumento das taxas de fotossíntese em folhas de algumas espécies (Field e Mooney, 1986, Pereira et al. 1994). Neste estudo, a adição de N não afectou a capacidade fotossintética das plantas (Cromer e Jarvis, 1990; Pereira et al. 1992). A eficiência do uso do azoto, diminuiu significativamente, sugerindo que o N não contribuiu para aumentar a taxa de fotossíntese.

6 Ciclo interno do azoto e crescimento de plantas de Sobreiro (*Quercus suber* L.). Relação com o fornecimento do azoto

6.1. Introdução

A remobilização de N a partir de tecidos mais antigos ou senescentes das árvores é um mecanismo importante de conservação de N nas árvores, proporcionando uma maior eficiência de uso deste nutriente (Miller, 1984; Crane e Banks, 1992; Millard, 1996; Fife e Nambiar, 1997). O armazenamento sazonal de N seguido de remobilização durante períodos ou surtos de crescimento são característicos de espécies arbóreas temperadas e boreais. Contrastando com as espécies caducifólias, a remobilização de N a partir das folhas velhas das espécies perenifólias pode ocorrer independentemente da senescência das folhas tanto em coníferas (Nambiar e Fife, 1987, 1991; Millard e Proe, 1992, 1993) como em folhosas de crescimento rápido (*Eucalyptus*) (Pereira et al, 1989; Carvalho et al 1993; Wendler et al, 1995). No entanto, Escudero et al (1992b), estudando a eficiência de retranslocação de N em *Quercus ilex*, uma espécie de folha persistente, constatam que a retranslocação de N armazenado nas folhas só se verifica aquando da senescência, de uma forma semelhante às espécies caducifólias. Outras fontes de N são as raízes (Tromp, 1983). Durante a senescência das raízes o N pode ser retranslocado para os tecidos em crescimento (Ferrier e Alexander, 1991; Millard e Proe, 1992). A capacidade das árvores para armazenar N durante o Inverno depende do crescimento anterior e determina a quantidade de N remobilizado na primavera seguinte, quantidade essa que normalmente não está dependente do N realmente disponível (Millard e Proe, 1991; Millard, 1993).

O sobreiro (*Quercus suber*) é uma árvore mediterrânica de folha persistente de crescimento lento que constitui o elemento dominante dos montados. A longevidade das folhas do sobreiro é relativamente curta (Pereira et al, 1987) quando comparada com

outros carvalhos de folha persistente, como, por exemplo, a azinheira (*Quercus ilex*) (Escudero et al, 1992a) ou com as coníferas mantêm as suas folhas por períodos mais longos. No sobreiro a senescência e queda das folhas ocorre na primavera imediatamente antes do rebentamento dos gomos vegetativos. É provável que o ciclo interno de N possa contribuir para o crescimento na primavera. Mais tarde, o crescimento (e possivelmente a aquisição de N) é limitado pela secura estival. Embora estudado como um processo importante nas florestas da zona temperada, poucos estudos existem sobre o ciclo interno de N nas árvores de folha persistente nas condições climáticas de tipo mediterrânico (Robert, 1997; Sabaté et al, 1995). Neste capítulo considera-se o crescimento e o ciclo interno de N de plantas jovens de *Quercus suber* em relação com o fornecimento de N, utilizando técnicas de marcação com o isótopo estável ^{15}N em soluções nutritivas aplicadas em vasos com areia, para determinar (1) o padrão sazonal de armazenamento e remobilização para o crescimento de plantas jovens de *Q. suber*, (2) a contribuição do ciclo interno comparativamente com a aquisição pelas raízes de N para o crescimento anual, e (3) se o fornecimento de N na primavera afecta a remobilização ou se, essa remobilização é somente determinada pela quantidade de N armazenada anteriormente nos órgãos das plantas.

6.2. Material e métodos

Semearam-se bolotas de *Q. suber* em vasos de areia de 10 litros. As plantas germinadas cresceram numa fase inicial utilizando as reservas existentes nas bolotas. Mais tarde separaram-se os cotilédones das plantas e iniciou-se a rega das plantas cada dois dias, até atingir a capacidade de campo, com uma solução nutritiva contendo 6.0 ("alto N") ou 1.0 ("baixo N") mol N.m^{-3} na forma de $^{15}\text{NH}_4^{15}\text{NO}_3$ (enriquecimento isotópico de 5% ^{15}N). Os outros nutrientes minerais foram fornecidos na solução preparada com base na formulação referida em Millard e Proe (1991) (quadro 6.1).

As plantas cresceram durante o Verão de forma a pré-condicionar o seu estado nutritivo no que diz respeito ao N. Em Fevereiro do segundo ano as plantas foram transplantadas para vasos de 60 litros cheios de areia lavada de forma a evitar contaminação com ^{15}N proveniente da areia utilizada no ano anterior. As plantas foram regadas até Março, momento em que se voltou a fornecer solução nutritiva às plantas.

Quadro 6.1 Composição da solução nutritiva utilizada para regar as plantas de *Q. suber*.

Composto	Fórmula	Concentração em mol.m ⁻³
Sulfato de magnésio heptahidratado	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,75 de Mg e 0,75 de S
Hydrogenofosfato de sódio	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	0,33 de P e 0,67 de Na
Sulfato de potássio	K_2SO_4	1,25 de K e 0,62 de S
Cloreto de Cálcio dihidratado	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2,0 de Ca
Sulfato de manganés heptahidratado	$\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,01 de Mn
Sulfato de zinco heptahidratado	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,001 de Zn
Sulfato de cobre pentahidratado	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,001 de Cu
Ácido bórico	H_3BO_3	0,05 de B
Citrato férrico pentahidratado	$\text{FeC}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,2 de Fe

As árvores que tinham recebido 6,0 mol N.m^{-3} no primeiro ano passaram a ser regadas com uma solução contendo 6,0 mol N.m^{-3} ("alto N") ou 1,0 mol N.m^{-3} ("alto N"/"baixo N"). Da mesma forma, as árvores que tinham recebido 1,0 mol N.m^{-3} no primeiro ano do ensaio passaram a ser regadas com uma solução contendo 6,0 mol N.m^{-3} ("baixo N"/"alto N") ou 1,0 mol N.m^{-3} ("baixo N"/"baixo N"). O N fornecido durante o segundo ano não estava marcado com ^{15}N .

Procedeu-se a uma amostragem no primeiro ano, antes do início do fornecimento de ^{15}N (Julho). Durante o segundo ano verificaram-se quatro amostragens, a primeira em Fevereiro e a última no final de Novembro. Em cada amostragem, recolheram-se ao acaso quatro plantas por cada tratamento. As plantas amostradas foram removidas dos vasos e separadas em raízes, caule, extensão caulinar do ano corrente, folhas e casca. Procedeu-se também à análise de crescimento das plantas. Também a área foliar, o número de folhas por planta e outras características das folhas como a área foliar específica (SLA) foram determinadas.

O isótopo ^{15}N foi utilizado como marcador de forma a calcular a aquisição de N pelas plantas durante o período em que se procedeu à marcação (primeiro ano) (Millard e Neilsen, 1989). O teor de N marcado de cada órgão das plantas no segundo ano dá uma medida da remobilização de N durante este período. As quantidades de N total e de ^{15}N nas amostras foram determinadas por espectrometria de massa.

6.3 Resultados

6.3.1 Crescimento das plantas

O fornecimento de soluções nutritivas de “alto” e de “baixo” N durante o primeiro ano do ensaio, pré-condicionou o crescimento das árvores (quadro 6.2). Quando as plantas foram transplantadas, em Fevereiro do segundo ano, as que tinham recebido “alto N” possuíam uma massa significativamente maior ($P < 0,05$) de caule e folhas. A área foliar era também mais elevada nas plantas que receberam mais N devido a um aumento do número de folhas, já que as dimensões das folhas consideradas individualmente não sofreu alterações significativas (quadro 6.3). Foi, no entanto o crescimento das raízes que contribuiu mais fortemente para o acréscimo de biomassa das plantas durante o primeiro ano do ensaio. As plantas “alto N” e “baixo N” apresentavam, respectivamente, 75% e 88% da biomassa total. Em consequência disto, verificou-se um decréscimo significativo na razão raiz/parte aérea nas plantas “alto N” ($3,25 \pm 0,35$) em comparação com as plantas “baixo N” ($6,4 \pm 1,14$).

O crescimento verificado durante os primeiros três meses do segundo ano, isto é, até Junho, foi independente do fornecimento de N nesse período (quadro 6.2). As raízes constituíram a maior parte do crescimento inicial na Primavera em todas as plantas. Não se verificaram diferenças no crescimento das folhas entre as plantas “alto N/alto N” e as “alto N/baixo N” ou entre as plantas “baixo N/alto N”. Após o mês de Junho, as plantas “baixo N/alto N” responderam ao fornecimento de N, e em Novembro tinham o mesmo peso das plantas “alto N/baixo N”. Entre Junho e Agosto, as folhas e os caules, desenvolveram-se a taxas superiores às do período anterior, sem se registarem diferenças entre plantas “alto N/alto N” e “alto N/baixo N”, quer em peso, quer em área foliar (quadros 6.2 e 6.3). Neste período, o acréscimo em biomassa e área foliar foi superior nas plantas “baixo N/alto N” (quadro 6.3).

Quadro 6.2. Efeito do fornecimento de N no crescimento de plantas de *Q. suber* no segundo ano do ensaio. Os valores são a média (\pm Erro padrão) de quatro repetições

Tratamento	Tccido	Biomassa da árvore (g.planta ⁻¹)				
		Fev	Jun	Ago	Nov	
Alto N/Alto N	Raízes	18.23 \pm 3.84	35.29 \pm 5.84	52.73 \pm 12.6	98.06 \pm 9.92	
	Caulo velho	2.27 \pm 0.47	4.51 \pm 0.49	9.64 \pm 3.96	19.65 \pm 7.59	
	Folhas velhas	3.80 \pm 0.66	4.60 \pm 1.16	3.82 \pm 0.79	3.34 \pm 0.57	
	Caulo novo	0.77 \pm 0.23	0.77 \pm 0.23	3.66 \pm 1.47	18.83 \pm 3.88	
	Folhas novas	4.86 \pm 1.27	4.86 \pm 1.27	9.77 \pm 4.17	25.31 \pm 6.38	
Alto N/Baixo N	Raízes	18.23 \pm 3.84	36.21 \pm 12.43	58.22 \pm 18.69	80.73 \pm 9.21	
	Caulo velho	2.27 \pm 0.47	3.59 \pm 1.16	8.13 \pm 3.38	10.76 \pm 1.73	
	Folhas velhas	3.80 \pm 0.66	3.18 \pm 1.67	3.66 \pm 0.79	3.61 \pm 0.58	
	Caulo novo	0.33 \pm 0.16	0.33 \pm 0.16	1.98 \pm 0.50	5.24 \pm 1.32	
	Folhas novas	2.73 \pm 1.60	2.73 \pm 1.60	8.92 \pm 2.98	11.56 \pm 2.12	
Baixo N/Alto N	Raízes	14.25 \pm 2.01	14.42 \pm 2.59	33.56 \pm 3.45	66.13 \pm 8.19	
	Caulo velho	0.70 \pm 0.05	1.11 \pm 0.31	3.87 \pm 0.51	7.59 \pm 1.87	
	Folhas velhas	1.62 \pm 0.15	1.09 \pm 0.30	0.38 \pm 0.07	0.73 \pm 0.2	
	Caulo novo	0.44 \pm 0.23	0.44 \pm 0.23	7.21 \pm 2.11	17.78 \pm 6.88	
	Folhas novas	2.14 \pm 0.62	2.14 \pm 0.62	14.75 \pm 3.59	16.48 \pm 4.71	
Baixo N/Baixo N	Raízes	14.25 \pm 2.01	18.31 \pm 2.71	21.05 \pm 0.59	38.80 \pm 3.73	
	Caulo velho	0.70 \pm 0.05	1.25 \pm 0.30	1.39 \pm 0.17	2.84 \pm 0.55	
	Folhas velhas	1.62 \pm 0.15	0.88 \pm 0.27	1.14 \pm 0.09	0.55 \pm 0.22	
	Caulo novo	0.30 \pm 0.13	0.30 \pm 0.13	0.66 \pm 0.28	2.45 \pm 0.77	
	Folhas novas	2.28 \pm 0.83	2.28 \pm 0.83	2.90 \pm 0.90	5.20 \pm 1.30	

Quadro 6.3. Efeito do fornecimento de N nas características e crescimento das folhas no segundo ano do ensaio. Os valores entre parêntesis são a área das folhas novas em percentagem da área foliar total. Os valores são a média (\pm Erro padrão) de quatro repetições. Os valores que compartilham a mesma letra no mesmo período de amostragem não são significativamente diferentes ($p < 0.05$).

Tratamento	Data	Crescimento das folhas			
		Área das folhas (cm ² planta ⁻¹)	Número de folhas	Área média por folha (cm ² folha ⁻¹)	SLA (cm ² g ⁻¹)
Alto N/Alto N	Jun	359.0 \pm 96.5 (55) ^a	114.3 \pm 37.0 ^a	3.45 \pm 0.42 ^a	69.6 \pm 3.2 ^a
	Ago	457.8 \pm 141.3 (64) ^a	162.5 \pm 57.5 ^a	3.24 \pm 0.47 ^a	53.5 \pm 3.6 ^a
	Nov	1653.1 \pm 396.7 (84) ^a	570.1 \pm 126.1 ^a	3.0 \pm 0.35 ^a	66.0 \pm 1.3 ^a
Alto N/Baixo N	Jun	260.0 \pm 182.8 (49) ^a	69.5 \pm 48.4 ^a	3.85 \pm 0.42 ^a	85.1 \pm 16.4 ^a
	Ago	651.2 \pm 227.8 (72) ^a	218.0 \pm 62.6 ^a	2.85 \pm 0.27 ^a	67.5 \pm 2.5 ^a
	Nov	741.2 \pm 132.27 (73) ^c	298.5 \pm 66.7 ^b	2.76 \pm 0.21 ^a	63.5 \pm 1.6 ^a
Baixo N/Alto N	Jun	187.5 \pm 51.5 (73) ^a	68.8 \pm 33.1 ^a	3.54 \pm 0.64 ^a	73.6 \pm 4.7 ^a
	Ago	1158.5 \pm 305.5 (97) ^b	605.3 \pm 252.6 ^a	2.52 \pm 0.54 ^a	77.2 \pm 6.2 ^a
	Nov	1178.7 \pm 355.5 (91) ^a	531.0 \pm 190.0 ^a	2.72 \pm 0.27 ^a	69.8 \pm 2.4 ^a
Baixo N/Baixo N	Jun	184.2 \pm 72.1 (69) ^a	71.8 \pm 26.6 ^a	2.52 \pm 0.05 ^a	71.2 \pm 4.8 ^a
	Ago	227.4 \pm 73.4 (63) ^c	156.7 \pm 55.3 ^a	2.36 \pm 0.60 ^a	68.5 \pm 5.1 ^a
	Nov	367.3 \pm 85.2 (90) ^b	148.3 \pm 42.1 ^c	2.67 \pm 0.25 ^a	70.6 \pm 2.1 ^a

A partir de Agosto, as folhas pararam de crescer excepto nas plantas “alto N/alto N”. O período entre amostragens foi longo e não permitiu uma determinação rigorosa do período de crescimento das folhas, mas é provável que esse período tenha terminado antes da última amostragem, em Novembro. A biomassa de folhas do ano anterior diminuiu ligeiramente em todas as plantas devido à abscisão de folhas senescentes (que representaram entre 7 e 16% da biomassa total das folhas). As raízes cresceram ao longo do segundo ano em todas as plantas, e em Novembro representavam uma proporção elevada do peso total das plantas em todos os tratamentos (62 a 79% do peso total das plantas) (quadro 6.2). Tal como no primeiro ano, no segundo, os aumentos de biomassa e de área das folhas foi devido a um aumento do número de folhas (quadro 6.3).

6.3.2 Remobilização de N

O fornecimento de N durante o segundo ano não teve influência na quantidade de N remobilizada (quadro 6.4). As plantas que receberam maiores quantidades de N no primeiro ano tinham remobilizado cerca de 80 mg N por árvore para as folhas e caules novos em Novembro do segundo ano, enquanto as plantas que receberam quantidades baixas de N remobilizaram cerca de 15 mg N por árvore.

Ocorreu remobilização a partir das raízes e das folhas do ano anterior logo que o crescimento se iniciou. As folhas novas em formação foram as *sinks* mais fortes para o N marcado entre Junho e Agosto do segundo ano, excepto nas plantas “baixo N/ “baixo N”, que tinham completado o crescimento entretanto. As quantidades remobilizadas neste período representaram uma parte significativa do N presente nas plantas, o que pode ter permitido o crescimento quando a absorção de N ainda era baixa. Em Junho o N remobilizado constituía 52% do N total nas plantas “alto N/baixo N” mas somente 10% do N total nas plantas “baixo N/alto N”. Estas proporções reduziram-se a 23% e 3% respectivamente no final do ensaio. Nas plantas “alto N/baixo N” o N foi remobilizado a partir das folhas velhas até Junho, mas entre Junho e Agosto as raízes tornaram-se as sources mais importantes para o crescimento das folhas novas (quadro 6.4). Isto pode explicar por que não se verificaram diferenças na biomassa das plantas “alto N/baixo N” e “alto N/alto N” até Agosto do segundo ano, quando a absorção de N pelas raízes aumentou (quadro 6.2).

Para ajudar a interpretar o padrão de remobilização de N nas plantas calculou-se a proporção de N marcado existente em cada tecido em relação ao N marcado total das plantas (quadro 6.5). Como o N marcado total se mantém constante ao longo do segundo ano, esta proporção reflecte as mudanças relativas na distribuição do N marcado nas plantas.

Quadro 6.4. Efeito do fornecimento de N na remobilização de N em *Q. sider* durante o segundo ano do ensaio. Os valores são a média (\pm Erro padrão) de quatro repetições.

Tratamento	Tecido	N marcado (mg.planta ⁻¹)				
		Fev	Jun	Ago	Nov	
Alto N/Alto N	Raízes	195.33 \pm 28.93	117.31 \pm 24.62	106.32 \pm 16.55	174.08 \pm 22.9	
	Caulo velho	30.10 \pm 6.20	20.15 \pm 3.04	18.32 \pm 4.96	24.83 \pm 5.56	
	Folhas velhas	69.50 \pm 14.88	49.38 \pm 13.92	35.44 \pm 9.37	23.66 \pm 4.29	
	Caulo novo		2.68 \pm 0.74	4.05 \pm 0.92	14.92 \pm 4.90	
	Folhas novas		4.06 \pm 4.06	57.17 \pm 22.08	64.64 \pm 13.99	
	Total		294.93 \pm 47.14	193.58 \pm 37.93	221.30 \pm 39.67	302.13 \pm 33.99
Alto N/Baixo N	Raízes	195.33 \pm 28.93	125.90 \pm 37.90	121.13 \pm 17.27	110.50 \pm 13.43	
	Caulo velho	31.10 \pm 6.20	17.02 \pm 5.20	18.93 \pm 7.20	16.67 \pm 2.52	
	Folhas velhas	69.50 \pm 14.88	29.75 \pm 25.42	37.56 \pm 8.89	29.89 \pm 5.91	
	Caulo novo		1.97 \pm 0.92	6.59 \pm 1.54	8.99 \pm 2.12	
	Folhas novas		10.35 \pm 4.64	82.88 \pm 45.62	79.88 \pm 13.45	
	Total		294.93 \pm 47.14	184.99 \pm 54.49	267.09 \pm 70.08	245.93 \pm 24.77
Baixo N/Alto N	Raízes	42.69 \pm 5.39	13.47 \pm 2.34	15.50 \pm 1.66	27.47 \pm 3.54	
	Caulo velho	3.58 \pm 0.51	1.79 \pm 0.51	1.76 \pm 0.50	2.75 \pm 0.67	
	Folhas velhas	7.71 \pm 1.07	3.82 \pm 1.32	1.07 \pm 0.38	1.96 \pm 0.72	
	Caulo novo		0.56 \pm 0.19	1.92 \pm 0.55	3.33 \pm 1.77	
	Folhas novas		4.56 \pm 1.46	13.95 \pm 1.74	14.27 \pm 2.69	
	Total		53.98 \pm 5.39	24.20 \pm 2.84	34.20 \pm 3.92	49.78 \pm 5.46
Baixo N/Baixo N	Raízes	42.69 \pm 5.39	18.70 \pm 1.16	23.01 \pm 7.63	29.76 \pm 6.18	
	Caulo velho	3.58 \pm 0.51	2.54 \pm 0.69	2.14 \pm 0.36	2.57 \pm 0.46	
	Folhas velhas	7.71 \pm 1.07	3.46 \pm 0.96	4.70 \pm 1.29	1.36 \pm 0.57	
	Caulo novo		0.68 \pm 0.28	0.87 \pm 0.31	0.97 \pm 0.29	
	Folhas novas		10.68 \pm 3.83	7.64 \pm 0.97	8.86 \pm 1.31	
	Total		53.98 \pm 5.39	36.06 \pm 5.07	38.36 \pm 7.73	43.52 \pm 7.74

Quadro 6.5. Efeito do fornecimento de N na proporção de N marcado nos tecidos relativamente ao N marcado total das plantas de *Q. sider* no segundo ano do ensaio. Os valores são a média (\pm Erro padrão) de quatro repetições

Tratamento	Tecido	N remobilizado				
		Fev	Jun	Ago	Nov	
Alto N/Alto N	Raízes	0.66 \pm 0.03	0.61 \pm 0.04	0.48 \pm 0.04	0.57 \pm 0.04	
	Caulo velho	0.10 \pm 0.01	0.11 \pm 0.01	0.08 \pm 0.01	0.08 \pm 0.01	
	Folhas velhas	0.24 \pm 0.02	0.24 \pm 0.05	0.16 \pm 0.04	0.08 \pm 0.02	
	Caulo novo		0.02 \pm 0.01	0.02 \pm 0.01	0.05 \pm 0.01	
	Folhas novas		0.02 \pm 0.01	0.26 \pm 0.08	0.22 \pm 0.05	
	Total		0.66 \pm 0.03	0.70 \pm 0.06	0.49 \pm 0.13	0.45 \pm 0.03
Alto N/Baixo N	Raízes	0.66 \pm 0.03	0.11 \pm 0.02	0.07 \pm 0.02	0.07 \pm 0.01	
	Caulo velho	0.10 \pm 0.01	0.12 \pm 0.06	0.16 \pm 0.04	0.12 \pm 0.02	
	Folhas velhas	0.24 \pm 0.02	0.01 \pm 0.01	0.03 \pm 0.01	0.04 \pm 0.01	
	Caulo novo		0.06 \pm 0.02	0.25 \pm 0.09	0.32 \pm 0.04	
	Folhas novas		0.78 \pm 0.03	0.52 \pm 0.18	0.45 \pm 0.02	0.54 \pm 0.07
	Total		0.78 \pm 0.03	0.08 \pm 0.01	0.05 \pm 0.01	0.06 \pm 0.01
Baixo N/Alto N	Raízes	0.07 \pm 0.01	0.16 \pm 0.04	0.04 \pm 0.02	0.04 \pm 0.01	
	Caulo velho	0.15 \pm 0.03	0.04 \pm 0.01	0.05 \pm 0.01	0.07 \pm 0.03	
	Folhas velhas		0.20 \pm 0.05	0.41 \pm 0.01	0.29 \pm 0.04	
	Caulo novo		0.78 \pm 0.03	0.54 \pm 0.06	0.69 \pm 0.04	
	Folhas novas		0.07 \pm 0.01	0.07 \pm 0.01	0.05 \pm 0.02	
	Total		0.15 \pm 0.03	0.11 \pm 0.03	0.10 \pm 0.03	0.03 \pm 0.01
Baixo N/Baixo N	Raízes	0.07 \pm 0.01	0.02 \pm 0.01	0.02 \pm 0.01	0.02 \pm 0.01	
	Caulo velho	0.15 \pm 0.03	0.26 \pm 0.07	0.16 \pm 0.01	0.20 \pm 0.04	
	Folhas velhas					
	Caulo novo					
	Folhas novas					
	Total		0.15 \pm 0.03	0.26 \pm 0.07	0.16 \pm 0.01	0.20 \pm 0.04

Após Agosto a proporção de N marcado existente nas folhas formadas no segundo ano (folhas novas) não aumentou. Em contrapartida, esta proporção baixou nas folhas velhas na medida em que aumentou nas raízes (quadro 6.5). Esta é uma indicação de que as raízes se tornaram o principal local de armazenamento de N proveniente das folhas velhas senescentes a partir de Agosto, quando as folhas novas já haviam parado de

crescer. Nas plantas “alto N/baixo N” este padrão não é tão claro já que as raízes parecem continuar a fornecer N para o crescimento de folhas novas até Novembro. Nas plantas “alto N/alto N” as folhas também continuaram a crescer após Agosto mas o momento exacto em que pararam de crescer antes de Novembro não pode ser estabelecido. Verificou-se translocação de N para as raízes antes de Novembro, especialmente nas plantas que receberam maiores quantidades de N no segundo ano (quadro 6.4).

6.3.3 Aquisição de N pelas raízes

A quantidade de N absorvida pelas plantas durante o segundo ano está avaliada por excesso já que uma pequena parte do N não-marcado presente nas partes novas das plantas era na verdade N do primeiro ano existente nas plantas antes do início da aplicação de ^{15}N remobilizado. Esta quantidade de N remobilizado não contabilizado é mais importante nas plantas que receberam “baixo N” no segundo ano, dado que nestas plantas o N não-marcado fornecido no segundo ano é inferior. A absorção de N pelas raízes durante o segundo ano continuou até ao final do ensaio (quadro 6.6).

Durante o período de crescimento inicial das plantas no segundo ano, de Fevereiro a Junho, o N absorvido constituiu uma proporção do N total mais baixa nas plantas que tinham recebido maiores quantidades de N no primeiro ano. Essa proporção foi mais elevada nas outras plantas. Como já foi salientado, a contribuição de N marcado (remobilizado) para o crescimento inicial de todas as plantas foi mais importante que o N absorvido. (quadros 6.4 e 6.6). No entanto, as quantidades de N não-marcado aumentaram drasticamente de Junho a Novembro (quadro 6.6). A maior parte do N adquirido pelas plantas no segundo ano, foi absorvido pelas raízes após Agosto, tendo duplicado a quantidade de N não-marcado de todas as plantas entre Agosto e Novembro. Neste período as concentrações das raízes das plantas “alto N/alto N” e “baixo N/baixo N” aumentaram de 12 para 16 mg.g^{-1} e de 8 para 12 mg.g^{-1} , respectivamente. Dado que as plantas aumentaram a sua biomassa neste período, o aumento da concentração destes tecidos indica uma acumulação e eventual armazenamento de N nas raízes, de forma a verificar-se remobilização para o crescimento do ano seguinte.

Quadro 6.6. Efeito do fornecimento de N na absorção de N pelas raízes de plantas de *Q. robur* durante o segundo ano do ensaio. Os valores são a média (\pm Erro padrão) de quatro repetições.

Tratamento	Tecido	N não-marcado (mg.planta^{-1})				
		Fev	Jun	Ago	Nov	
Alto N/Alto N	Raízes	67.87 \pm 9.28	217.98 \pm 12.09	513.22 \pm 110.99	1352.7 \pm 147.5	
	Caulo velho	5.63 \pm 0.88	31.86 \pm 1.07	86.54 \pm 26.64	208.26 \pm 46.16	
	Folhas velhas	20.65 \pm 3.01	28.87 \pm 5.45	38.38 \pm 9.18	36.82 \pm 8.23	
	Caulo novo		7.61 \pm 2.40	31.87 \pm 14.19	194.83 \pm 33.08	
	Folhas novas		5.82 \pm 5.82	148.10 \pm 64.53	496.47 \pm 136.7	
	Total		95.15 \pm 12.32	292.14 \pm 2.11	818.11 \pm 196.29	2289.1 \pm 305.4
Alto N/Baixo N	Raízes	67.87 \pm 9.28	134.69 \pm 29.80	295.69 \pm 60.90	579.53 \pm 67.47	
	Caulo velho	5.63 \pm 0.88	17.00 \pm 3.21	27.09 \pm 5.44	59.99 \pm 6.49	
	Folhas velhas	20.65 \pm 3.01	10.16 \pm 7.82	15.96 \pm 2.97	29.09 \pm 6.18	
	Caulo novo		1.83 \pm 0.65	10.69 \pm 1.76	36.14 \pm 8.89	
	Folhas novas		6.52 \pm 1.80	72.37 \pm 27.73	144.46 \pm 28.30	
	Total		95.15 \pm 12.32	170.20 \pm 35.82	421.80 \pm 87.54	849.21 \pm 77.52
Baixo N/Alto N	Raízes	61.76 \pm 6.43	138.75 \pm 6.83	420.58 \pm 30.39	972.93 \pm 131.4	
	Caulo velho	2.74 \pm 0.19	9.93 \pm 2.92	38.14 \pm 10.22	90.15 \pm 20.99	
	Folhas velhas	17.94 \pm 1.79	10.69 \pm 3.07	3.13 \pm 0.92	10.32 \pm 2.63	
	Caulo novo		5.79 \pm 2.89	86.08 \pm 21.28	165.42 \pm 68.73	
	Folhas novas		40.52 \pm 14.16	281.73 \pm 53.79	512.9 \pm 142.29	
	Total		82.44 \pm 6.55	205.68 \pm 25.64	829.66 \pm 96.37	1748.8 \pm 333.1
Baixo N/Baixo N	Raízes	61.76 \pm 6.43	91.89 \pm 21.20	144.41 \pm 19.40	420.91 \pm 46.48	
	Caulo velho	2.74 \pm 0.19	7.64 \pm 1.93	10.58 \pm 1.71	30.75 \pm 5.42	
	Folhas velhas	17.94 \pm 1.79	7.58 \pm 2.65	16.61 \pm 3.15	6.23 \pm 2.53	
	Caulo novo		2.82 \pm 1.25	8.61 \pm 2.41	21.07 \pm 5.32	
	Folhas novas		30.14 \pm 12.18	63.67 \pm 16.28	92.93 \pm 21.97	
	Total		82.44 \pm 6.55	140.07 \pm 34.63	243.88 \pm 21.31	571.89 \pm 70.68

6.4 Discussão

O crescimento das plantas de *Quercus suber* está positivamente relacionado com o fornecimento de N. O N necessário ao crescimento durante o segundo período vegetativo proveio do ciclo interno e da absorção pelas raízes. O crescimento inicial das folhas no segundo ano dependeu em grande medida da remobilização de N armazenado nas folhas velhas e raízes. Embora a disponibilidade de N para as plantas que receberam maior quantidade de N no segundo ano fosse considerável, a capacidade para absorver N era limitada nas primeiras semanas de crescimento, até Junho. Observou-se o mesmo padrão em plantas de *Pseudotsuga menziesii* (van den Driessche, 1985) e em ensaios de campo com as espécies arbóreas mediterrânicas *Quercus suber* (Oliveira et al, 1996) e com *Quercus ilex* (Sabaté et al., 1995).

O crescimento da parte aérea das plantas adultas de *Quercus suber* é pré-determinado, as folhas emergem e expandem-se durante 2 meses, com início em Abril até ao final de Junho, isto é, de uma forma geral, antes se verificarem as secas estivais (Pereira et al, 1987; Oliveira et al, 1994). Nas plantas novas (juvenis) este período é muito mais longo, podendo ser considerado como "crescimento livre", especialmente quando as plantas são regadas, como se verificou neste ensaio. O período extenso de remobilização de N, coincidente com o crescimento das folhas, que se observou nas árvores envasadas, está provavelmente relacionado com o facto das folhas se terem comportado como *sinks* fortes para o N. Em Agosto o crescimento das folhas havia cessado, excepto nas plantas "alto N/alto N^o", em que esse crescimento se estendeu para além de Agosto. Após este período, a absorção pelas raízes tornou-se a fonte predominante de N para o crescimento das plantas.

Em condições de campo, o período de remobilização coincide com o final da queda das folhas e ocorre antes da decomposição da folhada se intensificar (Pereira et al, 1987; Robert et al, 1996). Nestas condições, Escudero et al. (1992) registaram 48% de eficiência de retranslocação de N nas folhas de *Quercus suber*, embora este valor não seja comparável com os dados obtidos neste ensaio porque (1) as árvores medidas por aqueles autores eram adultas, de grandes dimensões e com a copa completamente formada e (2) a retranslocação de N foi estimada calculando a diferença do teor de N entre folhas verdes e folhas senescentes, subestimando portanto a contribuição do ciclo interno para a satisfação das necessidades das árvores em N (Millard e Proe, 1993). O N

que permanece na folhada não fica imediatamente disponível para as árvores devido à decomposição relativamente lenta da folhada (Madeira, 1986), cabendo ao N remobilizado um papel importante no crescimento da copa, apesar da competição inter-específica. Robert et al. (1996) concluiu que as folhas caídas na época de máxima taxa de queda de folhada possuem menor teor de N do que as folhas caídas durante o Inverno, sugerindo que o N das folhas velhas pode constituir uma reserva de N e outros nutrientes mobilizável em períodos de rápido crescimento.

Neste ensaio, nas árvores sujeitas a um fornecimento de N mais elevado durante o segundo ano, o ciclo interno contribuiu com 3-10% do N total das plantas porque o N armazenado no ano anterior era reduzido. A proporção de N derivado da remobilização por plantas jovens referida para outras espécies arbóreas é de 32-40% nas coníferas de folha persistente e 18-93% nas espécies de folha caduca (Millard, 1996). Neste estudo, os valores encontrados variaram entre 3-56%, dependendo do estado nutricional das árvores.

A capacidade de remobilização de N depende do fornecimento de N às árvores no ano anterior, e não foi afectada pelo fornecimento do próprio ano. O mesmo padrão foi encontrado em ensaios semelhantes realizados com outras espécies arbóreas, de folha caduca e de folha persistente (Millard e Proe, 1991, 1992). Estes resultados sugerem que a quantidade de N armazenado é determinante da remobilização verificada na Primavera, e que a fertilização com N aumenta o armazenamento de N mas não afecta a eficiência com que o N armazenado é subsequentemente reciclado no interior das árvores (Millard, 1996). A quantidade de N armazenado foi importante para o crescimento inicial, especialmente nas árvores "alto N/baixo N", em que 52% do N total proveio do ciclo interno. Esta a razão por que estas plantas não apresentaram diferenças significativas em relação às árvores "baixo N/ alto N" e "alto N/alto N", considerando o crescimento verificado até Agosto. Verificaram-se contribuições do ciclo interno do N em proporções idênticas em ensaios com *Acer pseudoplatanus* (Millard e Proe, 1991) e *Betula pendula* (Wendler e Millard, 1995).

O principal local de armazenamento de N durante o Inverno foram as raízes, mas as folhas velhas também desempenharam esse papel e contribuíram significativamente para o ciclo interno de N na Primavera. Nas coníferas, o N fica armazenado durante o Inverno nas agulhas e é remobilizado na Primavera para o crescimento das folhas novas independentemente da ocorrência da senescência (van den Driessche, 1985; Nambiar e

crescimento das plantas de *Quercus siber* está positivamente relacionado com o teor de N. O N necessário ao crescimento durante o segundo período do ciclo interno e da absorção pelas raízes. O crescimento inicial das plantas depende em grande medida da remobilização de N armazenado nas raízes. Embora a disponibilidade de N para as plantas que receberam o N no segundo ano fosse considerável, a capacidade para absorver N nas primeiras semanas de crescimento, até Junho. Observou-se o mesmo padrão em plantas de *Pseudotsuga menziesii* (van den Driessche, 1985) e em ensaios de outras espécies arbóreas mediterrânicas *Quercus siber* (Oliveira et al., 1996) e *Pinus* (Sabaté et al., 1995).

O crescimento da parte aérea das plantas adultas de *Quercus siber* é pré-folhas emergem e expandem-se durante 2 meses, com início em Abril até Maio, isto é, de uma forma geral, antes se verificarem as secas estivais (Oliveira et al., 1994). Nas plantas novas (juvenis) este período é mais longo, podendo ser considerado como "crescimento livre", especialmente nas plantas são regadas, como se verificou neste ensaio. O período extenso de crescimento de N, coincidente com o crescimento das folhas, que se observou nas plantas, está provavelmente relacionado com o facto das folhas se terem desenvolvido antes do N. Em Agosto o crescimento das folhas havia atingido o máximo, o que sugere que o N armazenado se estendeu para o ciclo interno. Após este período, a absorção pelas raízes tornou-se a fonte principal de N para o crescimento das plantas.

O período de crescimento das plantas coincide com o final da estação de campo, o período de remobilização coincide com o final da estação e ocorre antes da decomposição da folhada se intensificar (Pereira et al., 1996). Nestas condições, Escudero et al. (1992) registaram 48% de translocação de N nas folhas de *Quercus siber*, embora este valor não seja comparável com os dados obtidos neste ensaio porque (1) as árvores medidas por eles eram adultas, de grandes dimensões e com a copa completamente desenvolvida, (2) a retranslocação de N foi estimada calculando a diferença do teor de N nas folhas senescentes, subestimando portanto a contribuição do ciclo interno para a satisfação das necessidades das árvores em N (Millard e Proe, 1993). O N

Fife, 1991; Helmisari, 1992; Millard e Proe, 1992). A absorção de N pelas raízes foi maior no final do período de crescimento, quando as folhas haviam cessado de crescer. Idêntica observação foi efectuada em plantas de *Picea sitchensis* (Millard e Proe, 1992). O N absorvido no final do Verão e princípio do Outono (quando regressam as chuvas, nos climas mediterrânicos) foi principalmente repartido pelas raízes, permanecendo como tal durante o Inverno, contribuindo para o estado nutricional das plantas e sua capacidade de remobilização de N no ano seguinte. O armazenamento de N nas raízes foi constatado em macieiras (Tromp, 1983) e *Pseudotsuga menziesii* (van den Driessche, 1985). Também foi observado em estudos com isótopos ^{15}N em amendoeiras (Weinbaum et al, 1984), pereiras (Sanchez et al, 1991) e pessegueiros (Muñoz et al, 1993). O efeito da fertilização no Outono no ciclo interno do N ficou demonstrado em *Acer pseudoplatamus* e *Fraxinus excelsior* (Millard, 1995).

Fife, 1991; Helmisari, 1992; Millard e Proe, 1992). A absorção de N pelas raízes foi maior no final do período de crescimento, quando as folhas haviam cessado de crescer. Idêntica observação foi efectuada em plantas de *Picea sitchensis* (Millard e Proe, 1992). O N absorvido no final do Verão e princípio do Outono (quando regressam as chuvas, nos climas mediterrânicos) foi principalmente repartido pelas raízes, permanecendo como tal durante o Inverno, contribuindo para o estado nutricional das plantas e sua capacidade de remobilização de N no ano seguinte. O armazenamento de N nas raízes foi constatado em macieiras (Tromp, 1983) e *Pseudotsuga menziesii* (van den Driessche, 1985). Também foi observado em estudos com isótopos ^{15}N em amendoeiras (Weinbaum et al, 1984), pereiras (Sanchez et al, 1991) e pessegueiros (Muñoz et al, 1993). O efeito da fertilização no Outono no ciclo interno do N ficou demonstrado em *Acer pseudoplatanus* e *Fraxinus excelsior* (Millard, 1995).

7 Influência do CO_2 elevado e da nutrição azotada no crescimento e remobilização do N em plantas de *Fraxinus angustifolia* Vahl.

7.1 Introdução

As consequências de alterações climáticas globais provocadas pelo aumento da emissão de gases geradores do efeito de estufa (CO_2 , metano, óxidos de azoto e CFC's) é uma questão que interessa a sociedade de forma global. Destes gases o CO_2 é o que mais contribui para o efeito de estufa (van Kooten et al, 1993, cit. por Kimmins, 1996) e a sua concentração na atmosfera tem vindo a aumentar nos últimos 50 anos esperando-se que, a manter-se as tendências actuais, o seu valor duplicará em meados do século XXI (Kimmins, 1996). Esta previsão tem orientado os trabalhos científicos em torno das questões do papel das florestas no ciclo global do carbono (nomeadamente como *sink* de C, aumentando o tempo de residência do C na biosfera, devido à longevidade das árvores) (Kimmins, 1996) e dos efeitos do aumento da concentração de CO_2 na atmosfera sobre a fisiologia das plantas, nomeadamente, das plantas lenhosas (Ceulemans e Mousseau, 1994).

O CO_2 é um gás existente na atmosfera que constitui a fonte de carbono dos organismos fotossintéticos. A sua concentração actual no ar (aproximadamente 350 ppm) condiciona fortemente a disponibilidade de CO_2 para as células fotossintéticas das plantas C_3 , por sua vez regulada por uma série de resistências à difusão, relacionadas com as características das folhas (Kozlowsky e Pallardy, 1997). Por estas razões, os efeitos potenciais de um aumento da concentração atmosférica do CO_2 sobre a fotossíntese têm gerado grande interesse, na perspectiva de um aumento do crescimento das plantas e da produtividade dos ecossistemas. No entanto, os aumentos mais significativos da produção de plantas verificados no domínio das plantas cultivadas têm sido alcançados à custa de alterações na partição do C por diferentes órgãos das plantas,

aumentando o índice de colheita, também chamado coeficiente de produção económica (razão entre o peso seco de partes vegetais de importância económica e o peso seco total), do que propriamente através de aumentos significativos das taxas de fotossíntese (Gifford et al, 1984).

O crescimento das árvores expostas a CO₂ elevado é de uma maneira geral, e apesar da variedade de protocolos experimentais, estimulado devido a um aumento da assimilação de carbono, sobretudo quando as plantas não se encontram limitadas por elementos minerais, água ou luz (Ceulemans e Mousseau, 1994). Em estudos de curto prazo (< 6 meses) envolvendo árvores expostas a CO₂ elevado, e variando a disponibilidade de outros recursos, verificaram-se aumentos médios da biomassa total de 38% para as coníferas (12 espécies) e 61% para espécies de folha caduca (52 espécies) e aumentos na fotossíntese de 40% nas primeiras e 61% nas segundas (Ceulemans e Mousseau, 1994). Em estudos de longo prazo (mais de 1 ano), a resposta no crescimento das árvores expostas a CO₂ elevado tende a ser mais moderada em relação aos estudos de curto prazo, e muitas vezes os efeitos da elevação do CO₂ não são duradouros, verificando-se respostas cada vez mais pequenas, à medida que o tempo passa (Lee e Jarvis, 1995; Poorter et al, 1996). Por exemplo, verificaram-se aumentos da taxa de crescimento em *Quercus suber* nos primeiros meses de exposição a CO₂ elevado (Damesin et al, 1996), mas em plantas sujeitas a condições idênticas durante períodos mais longos os efeitos anularam-se (Pereira e Chaves, 1997). O decréscimo da taxa de crescimento após exposições prolongadas a CO₂ elevado pode resultar de alterações na partição de biomassa (sobretudo na proporção da biomassa foliar) e/ou de uma aclimatação (*down-regulation*) da fotossíntese, isto é, uma redução da capacidade fotossintética em relação às plantas expostas ao CO₂ ambiente (Gunderson e Wullschlegel, 1994; Pereira e Chaves, 1997). Esta aclimatação pode ser o resultado de limitações genéticas ou ambientais, reduzindo *sinks* para os hidratos de carbono sintetizados pelas plantas (Stitt, 1991; Sage, 1994). A acumulação de açúcares relativamente às suas necessidades pelas plantas pode estar associada à aclimatação fotossintética, através de um mecanismo de repressão pelos açúcares de um gene (*rbcS*), responsável pela síntese de uma subunidade da Rubisco (Van Oosten e Besford, 1994).

A interação entre CO₂ elevado e a nutrição mineral das plantas, particularmente o N, é uma questão importante. Os solos florestais são normalmente pobres em N. No entanto, as alterações nas políticas de uso dos solos e a conversão de terras agrícolas em

terras florestais ou agro-florestais, e a deposição de quantidades cada vez maiores de N nos solos, devida à poluição, leva a considerar maior variedade de condições de crescimento das árvores florestais. A deficiência de N altera a partição da biomassa das plantas, modificando também as relações *source:sink*, sobretudo restringindo o crescimento da parte aérea em relação às raízes.

Como ficou escrito no capítulo 2, uma parte importante do N utilizado para o crescimento nas árvores de folha caduca provém da remobilização de N armazenado. Um processo chave no ciclo interno do N nestas árvores é a remobilização de N das folhas durante a senescência, para os caules (troncos e ramos) e raízes, locais de armazenamento durante o Inverno (Millard, 1996). A remobilização do N armazenado contribui para o crescimento primaveril das folhas (Millard e Proe, 1991). Factores ambientais, como as disponibilidades de água, a radiação, ou as alterações do clima, como o aumento da concentração de CO₂ atmosférico, condicionam as condições de crescimento das plantas, interagindo com as condições de nutrição azotada. Os efeitos resultantes dessa interação, nomeadamente na partição da biomassa, podem modificar as características e o padrão do ciclo interno do N, tanto ao nível das folhas, como da árvore.

O freixo, *Fraxinus angustifolia* Vahl., é uma espécie arbórea caducifolia da bacia Mediterrânica, que ocorre espontaneamente nas margens dos rios, à beira de caminhos e em sítios frescos. Para além de produzir boa madeira e do valor paisagístico, as suas folhas podem ser utilizadas como alimento para gado nos sistemas silvo-pastoris tradicionais e possuem propriedades medicinais (Gonzalez, 1991). Pareceu importante estudar uma espécie caducifolia em contraste com as perenifólias já apresentadas noutros capítulos desta tese. Neste capítulo apresentam-se os resultados do estudo da interação entre CO₂ elevado na atmosfera e nutrição azotada no ciclo interno do azoto no freixo. Para tal utilizaram-se técnicas de marcação com o isótopo estável ¹⁵N em soluções nutritivas aplicadas em vasos com areia, para averiguar: (1) quais os efeitos da exposição ao CO₂ elevado no crescimento das árvores; (2) quais os efeitos da disponibilidade do N na resposta ao CO₂ elevado e (3) se a exposição ao CO₂ elevado alterou a contribuição do armazenamento e remobilização de N para o crescimento de plantas de *Fraxinus angustifolia*.

7.2 Material vegetal e condições experimentais

Plantas de *Fraxinus angustifolia* com cerca de 3 meses em vasos de 10 litros com areia foram transferidas do ar livre para estufas semelhantes e sujeitas a duas concentrações diferentes de CO₂ (700 µmol. mol⁻¹ e 350 µmol. mol⁻¹). A temperatura no interior das estufas equivalia às condições médias (máximas, durante o dia, e mínimas, durante a noite) verificadas em Lisboa nos últimos 30 anos. A humidade relativa foi mantida a 50% e a intensidade luminosa era 20% inferior à verificada no exterior das estufas. As plantas foram regadas cada dois dias, até atingir a capacidade de campo, com soluções nutritivas contendo dois níveis de fertilização azotada: 6,0 mol N. m⁻³ ("alto N") e 1,0 mol N.m⁻³ ("baixo N") na forma de NH₄NO₃, durante 14 meses (ver composição da solução nutritiva no capítulo 6).

As plantas cresceram durante o Verão de modo a pré-condicionar o seu estado nutritivo no que diz respeito ao N, obtendo-se desta forma plantas sujeitas a 4 tratamentos - CO₂ ambiente/"baixo N" (LC/LN); CO₂ ambiente/"alto N" (LC/LN); CO₂ elevado/"baixo N" (HC/LN) e CO₂ elevado/"alto N" (HC/HN). Antes do amarelecimento das folhas, em Outubro, foi efectuada a primeira amostragem. As plantas amostradas foram retiradas dos vasos e separadas em raízes, caule e folhas. A área foliar e outras características das plantas foram também determinadas. Em Janeiro do ano seguinte as plantas foram transferidas para vasos semelhantes mas com areia lavada. Durante o Inverno as plantas foram regadas com água destilada. Em Março, mantiveram-se os tratamentos, mas o azoto fornecido nas soluções nutritivas passou a ser enriquecido com o isótopo ¹⁵N (5,12 %), utilizado como marcador. Deste modo é possível distinguir o N remobilizado do N absorvido no segundo ano (marcado com ¹⁵N). As quantidades de N total e de ¹⁵N nas amostras foram determinadas por espectrometria de massa.

Procedeu-se a mais duas amostragens no segundo ano, em Maio e Agosto. Em cada amostragem recolheram-se ao acaso seis plantas por cada tratamento. Nas amostragens efectuadas no segundo ano as plantas foram separadas em raízes, caule (caule velho), caule formado no ano corrente (caule novo) e folhas.

7.3. Resultados

7.3.1 Crescimento das árvores

Durante os primeiros meses, no primeiro período vegetativo, as plantas sujeitas a CO₂ elevado apresentaram um ligeiro aumento da biomassa total, quando comparadas com as plantas sujeitas CO₂ atmosférico, para ambos os níveis de fertilização azotada (quadro 7.1). Neste período, o crescimento das folhas praticamente não foi afectado pelo CO₂ elevado. Ao contrário, as raízes, representando a maior parte da biomassa das plantas, e o caule, apresentaram respostas significativas ao CO₂ elevado.

Quadro 7.1. Efeito do fornecimento de N e da exposição ao CO₂ elevado no crescimento de plantas de *Fraxinus angustifolia*. Os valores são a média (± erro padrão) de seis repetições

Tratamento	Tecido	Biomassa da árvore (g.plantia ⁻¹)			
		Out	Jan	Mai	Ago
LC/LN	Raízes	13,84 ± 1,29	15,30 ± 2,15	27,40 ± 3,42	56,60 ± 4,28
	Caulc	3,95 ± 0,58	2,86 ± 0,36	8,38 ± 0,89	12,06 ± 1,34
	Folhas	2,13 ± 0,25	1,9 ± 0,27*	6,11 ± 0,40	7,47 ± 0,60
	Total	19,92 ± 1,98	18,16 ± 2,43	41,89 ± 4,58	76,12 ± 5,47
LC/HN	Raízes	14,51 ± 1,00	20,37 ± 2,77	38,99 ± 3,65	125,21 ± 4,03
	Caulc	4,69 ± 0,31	4,81 ± 1,19	13,59 ± 1,16	33,84 ± 3,46
	Folhas	2,66 ± 0,28	2,49 ± 0,29*	16,28 ± 0,78	27,90 ± 2,19
	Total	21,87 ± 1,47	25,18 ± 3,89	68,86 ± 4,70	186,95 ± 9,16
HC/LN	Raízes	19,76 ± 2,18	23,63 ± 1,24	34,08 ± 2,40	63,33 ± 3,76
	Caulc	5,25 ± 0,87	4,68 ± 0,43	8,31 ± 0,90	14,12 ± 2,02
	Folhas	2,37 ± 0,50	2,05 ± 0,19*	7,29 ± 0,97	7,44 ± 0,61
	Total	27,39 ± 3,41	28,31 ± 1,49	49,68 ± 3,95	84,89 ± 5,08
HC/HN	Raízes	17,21 ± 1,11	21,24 ± 3,58	55,17 ± 1,64	125,26 ± 3,34
	Caulc	5,44 ± 0,60	5,23 ± 1,15	17,77 ± 0,98	35,82 ± 3,48
	Folhas	2,63 ± 0,29	2,68 ± 0,21*	18,89 ± 0,46	25,45 ± 1,37
	Total	25,28 ± 1,92	26,47 ± 4,62	91,83 ± 1,51	186,52 ± 6,88

* Folhada

As razões de produção (razão de peso seco para 750/350 ppm CO₂) foram maiores nas plantas LN ("baixo N") do que nas plantas HN ("alto N") (quadro 7.2).

No final do segundo período vegetativo, correspondente a um maior período de exposição ao CO₂ elevado, o crescimento das plantas sujeitas ao CO₂ elevado não era significativamente diferente das plantas sujeitas a CO₂ atmosférico. Na Primavera (Maio), ainda se verificou um ligeiro aumento na razão de produção das plantas HN (quadro 7.2), mas no Verão (Agosto) essas diferenças já não eram perceptíveis. A estrutura das plantas, isto é, a partição da biomassa pelo diferentes órgãos, não foi alterada pelo CO₂ elevado (quadro 7.1). As diferenças na distribuição da biomassa, são provenientes dos níveis de nutrição azotada, tendo o tratamento HN alterado essa distribuição, nomeadamente aumentando a proporção de folhas na biomassa total, sobretudo na Primavera (quadro 7.1). No Verão, as folhas das plantas LN praticamente tinham parado de crescer (ver também quadro 7.3), enquanto as raízes duplicaram a sua biomassa, resultando num aumento da razão raiz/parte aérea (quadro 7.3). Este efeito também se produziu nas plantas HN, embora a biomassa das folhas não tenham deixado de aumentar ligeiramente (quadros 7.1 e 7.3).

Quadro 7.2. Razões de produção (razão de peso seco para 750/350 ppm CO₂) em plantas de *Fraxinus angustifolia* sujeitas a dois níveis de fornecimento de N

Tratamento	Razão de produção		
	Out	Mai	Ago
LN	1,375	1,186	1,115
HN	1,156	1,334	0,998

O quadro 7.3 mostra algumas características das plantas decorrentes da análise de crescimento efectuada. A razão de área foliar (LAR) corresponde à razão da área foliar pela biomassa total da planta e caracteriza a dimensão relativa do aparelho assimilador relativamente à biomassa respiratória. A área foliar específica (SLA) representa a razão entre a área foliar e a biomassa foliar seca. Nas plantas HN a LAR é superior às plantas LN, sobretudo na Primavera, quando o crescimento das folhas era activo, não se verificando qualquer efeito do CO₂ elevado (quadro 7.3). No Verão, os valores da LAR

decrecem de forma sistemática em todos os tratamentos, sobretudo devido ao maior desenvolvimento relativo das raízes nesse período, e à paragem (plantas LN) ou abrandamento do crescimento das folhas (plantas HN). A SLA decresce ao longo do segundo período vegetativo em todas as plantas, embora esse decréscimo seja mais acentuado nas plantas HN, independentemente do tratamento de CO₂ (quadro 7.3).

Quadro 7.3. Efeito do fornecimento de N e da exposição ao CO₂ elevado na área foliar e outras características das folhas e de partição da biomassa de plantas de *Fraxinus angustifolia*. Os valores são a média (± erro padrão) de seis repetições. Os valores que compartilham a mesma letra no mesmo período de amostragem não são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Tratamento	Área foliar	SLA	LAR	R/S
LC/LN				
Out	248,4 ± 11,2 ^a	150,7 ± 5,1 ^a	12,4 ± 0,4 ^a	2,32 ± 0,04 ^a
Mai	610,4 ± 20,6 ^a	120,2 ± 5,8 ^a	15,4 ± 1,6 ^a	1,87 ± 0,12 ^a
Ago	618,5 ± 26,6 ^a	99,4 ± 8,4 ^a	8,3 ± 0,5 ^a	2,90 ± 0,12 ^a
LC/HN				
Out	257,5 ± 12,3 ^a	117,8 ± 1,9 ^b	11,5 ± 0,3 ^a	1,98 ± 0,04 ^b
Mai	1600,5 ± 75,7 ^b	115,2 ± 7,5 ^a	23,4 ± 0,7 ^b	1,31 ± 0,12 ^b
Ago	1971,8 ± 100,6 ^b	81,2 ± 3,0 ^a	10,6 ± 0,3 ^b	2,09 ± 0,12 ^b
HC/LN				
Out	256,9 ± 24,5 ^a	131,4 ± 2,8 ^a	8,7 ± 0,5 ^a	2,74 ± 0,08 ^c
Mai	656,9 ± 80,3 ^a	106,6 ± 3,4 ^a	13,1 ± 0,9 ^a	2,23 ± 0,08 ^a
Ago	621,9 ± 42,7 ^a	98,8 ± 2,4 ^a	7,3 ± 0,3 ^a	3,04 ± 0,24 ^a
HC/HN				
Out	256,2 ± 13,7 ^a	118,9 ± 1,9 ^b	10,0 ± 0,3 ^a	2,18 ± 0,04 ^b
Mai	1837,6 ± 43,9 ^b	114,4 ± 2,3 ^a	20,1 ± 0,7 ^b	1,52 ± 0,08 ^b
Ago	1997,9 ± 153,8 ^b	90,2 ± 4,4 ^a	10,7 ± 0,6 ^b	2,10 ± 0,16 ^b

Pode concluir-se que a resposta das plantas a uma exposição prolongada a CO₂ elevado é praticamente negligenciável. O crescimento e a distribuição da biomassa pelos diferentes órgãos nas plantas de *Fraxinus angustifolia* está relacionada fortemente com os níveis de N fornecidos nas soluções nutritivas.

7.3.2 N nas árvores (distribuição e concentração)

No segundo período vegetativo, o N presente nas plantas é significativamente superior em todos os órgãos das plantas HN em relação às plantas LN (quadro 7.4). A exposição prolongada a CO₂ elevado não afectou o teor nem a distribuição do N nas plantas. Por seu lado, ambas as características dependem fundamentalmente dos níveis de N fornecido às plantas. Nas plantas LN o teor de N das folhas decresce entre Maio e Agosto. Como a biomassa das folhas se manteve constante (quadro 7.1), este facto indica a ocorrência de retranslocação de N a partir das folhas. Nas plantas HN o teor de N aumenta ligeiramente.

Os efeitos do fornecimento de N sobre a concentração de N, quer dos órgãos quer das plantas na sua totalidade, decorrem das observações anteriores sobre o crescimento das plantas e o seu teor de N. Uma vez mais, a exposição prolongada ao CO₂ elevado não afecta as concentrações de N, para cada nível de fornecimento de N (quadro 7.4).

7.3.3 Remobilização do N

O ¹⁵N (N marcado) recuperado nos tecidos das plantas durante o segundo período vegetativo representa o N adquirido pelas plantas durante esse período, enquanto o N restante representa o N armazenado anteriormente e remobilizado durante o segundo período vegetativo. O quadro 7.5 permite comparar as quantidades de N remobilizado e absorvido na Primavera e no Verão do segundo período vegetativo. As árvores HN remobilizaram o dobro de N das árvores LN para as folhas na Primavera do segundo período vegetativo. Em Maio a contribuição do N proveniente da remobilização para o crescimento das folhas representava cerca de 85% do N das folhas das plantas LN e cerca de 53% do N das folhas das plantas HN (quadro 7.5). Em Agosto, o N proveniente da remobilização representava ainda 72% do N das folhas e 54% do N total presente nas plantas LN; e respectivamente 38% e 30% nas plantas HN. Estes resultados são independentes da exposição prolongada ao CO₂ e demonstram a importância em termos

7.2 Material vegetal e c

Plantas de *Fraxin*

areia foram transferidas para estufas diferentes durante a noite) verificou-se que a concentração de N em plantas de *Fraxinus angustifolia*. Os valores são a média (\pm erro padrão) de seis repetições

As plantas criadas em estufas com solução nutritiva com 1,0 mol N.m⁻² apresentaram maior concentração de N em todos os órgãos das plantas HN em relação às plantas LN (quadro 7.1), este resultado indica a ocorrência de retranslocação de N a partir das folhas. Nas plantas HN o teor de N aumenta ligeiramente.

Os efeitos do fornecimento de N sobre a concentração de N, quer dos órgãos das plantas na sua totalidade, decorrem das observações anteriores sobre o crescimento das plantas e o seu teor de N. Uma vez mais, a exposição prolongada a CO₂ elevado não afecta as concentrações de N, para cada nível de fornecimento de N (quadro 7.4).

7.3.3 Remobilização do N

O ¹⁵N (N marcado) recuperado nos tecidos das plantas durante o segundo período vegetativo representa o N adquirido pelas plantas durante esse período, enquanto o restante representa o N armazenado anteriormente e remobilizado durante o segundo período vegetativo. O quadro 7.5 permite comparar as quantidades de N remobilizadas durante o período vegetativo em Primavera e no Verão do segundo período vegetativo. As árvores de *Fraxinus* remobilizaram o dobro de N das plantas LN para as folhas na Primavera do segundo período vegetativo. Em Maio a contribuição do N proveniente da remobilização para o crescimento das folhas representava cerca de 85% do N das folhas das plantas LN, cerca de 53% do N das folhas das plantas HN (quadro 7.5). Em Agosto, o N proveniente da remobilização representava ainda 72% do N das folhas e 54% do N total presente nas plantas LN; e respectivamente 38% e 30% nas plantas HN. Estes resultados são independentes da exposição prolongada a CO₂ e demonstram a importância em termos de N da remobilização do ciclo interno do N para o crescimento das plantas de *Fraxinus angustifolia* com disponibilidades contrastantes de N. O decréscimo verificado na quantidade de N remobilizado presente nas folhas das árvores, mais acentuado nas plantas LN, é acompanhado por um aumento significativo das parcelas equivalentes nas

Quadro 7.4. Efeito do fornecimento de N e da exposição ao CO₂ elevado no teor de N e na concentração de N em plantas de *Fraxinus angustifolia*. Os valores são a média (\pm erro padrão) de seis repetições

Tratamento	Tecido	Concentração de N			
		Mai	Agosto	Agosto	
LC/LN	Raízes	176,20 \pm 11,65	353,82 \pm 25,64	6,78 \pm 0,62	6,28 \pm 0,20
	Caulo velho	26,61 \pm 2,85	30,35 \pm 2,23	3,81 \pm 0,22	3,49 \pm 0,26
	Caulo novo	9,50 \pm 3,21	10,19 \pm 1,99	9,90 \pm 4,80	3,42 \pm 0,48
	Folhas	95,08 \pm 4,56	67,57 \pm 4,98	15,91 \pm 1,40	9,11 \pm 0,36
	Total	307,39 \pm 16,30	461,93 \pm 30,95	7,78 \pm 0,89	6,05 \pm 0,13
LC/HN	Raízes	372,10 \pm 33,66	1081,45 \pm 56,94	9,69 \pm 0,66	8,63 \pm 0,28
	Caulo velho	54,98 \pm 2,68	118,73 \pm 12,80	6,16 \pm 0,16	5,91 \pm 0,33
	Caulo novo	37,90 \pm 5,81	84,25 \pm 8,03	8,12 \pm 0,29	6,51 \pm 0,46
	Folhas	330,73 \pm 12,23	411,05 \pm 47,89	20,46 \pm 0,94	15,21 \pm 2,06
	Total	795,71 \pm 45,75	1695,48 \pm 47,82	11,64 \pm 0,47	9,16 \pm 0,29
HC/LN	Raízes	204,47 \pm 7,43	365,83 \pm 13,70	6,08 \pm 0,25	5,85 \pm 0,30
	Caulo velho	21,93 \pm 2,34	30,26 \pm 2,98	3,41 \pm 0,08	3,30 \pm 0,33
	Caulo novo	8,59 \pm 1,54	15,08 \pm 1,83	4,65 \pm 0,37	4,22 \pm 0,40
	Folhas	87,12 \pm 7,96	63,49 \pm 4,29	12,34 \pm 0,68	8,60 \pm 0,30
	Total	322,11 \pm 17,99	474,65 \pm 17,77	6,42 \pm 0,14	5,67 \pm 0,23
HC/HN	Raízes	481,29 \pm 23,90	1240,77 \pm 44,53	8,71 \pm 0,31	9,92 \pm 0,36
	Caulo velho	51,52 \pm 2,33	122,14 \pm 6,98	5,24 \pm 0,15	6,20 \pm 0,69
	Caulo novo	44,40 \pm 7,94	101,61 \pm 6,72	5,34 \pm 0,73	6,93 \pm 0,56
	Folhas	347,32 \pm 1,67	392,59 \pm 25,88	18,44 \pm 0,41	15,42 \pm 0,49
	Total	924,53 \pm 18,47	1857,12 \pm 52,21	9,86 \pm 0,11	9,99 \pm 0,29

raízes, sugerindo uma remobilização para as raízes num período em que as folhas já finalizaram a sua expansão (quadros 7.5 e 7.6). Esta observação leva a supor que o armazenamento de N durante o Inverno ocorra predominantemente nas raízes. A exposição prolongada ao CO₂ elevado não teve efeitos significativos sobre a remobilização do N. Esta está dependente do fornecimento de N às plantas.

Quadro 7.5. Efeito do fornecimento de N e da exposição ao CO₂ elevado na remobilização e aquisição de N durante o segundo período vegetativo em plantas de *Fraxinus angustifolia*. Os valores são a média (\pm erro padrão) de seis repetições

Tratamento	Tecido	N Remobilizado		N absorvido	
		Mai	Ago	Mai	Ago
LC/LN	Raízes	127,62 \pm 10,83	169,40 \pm 14,03	48,58 \pm 4,21	184,42 \pm 12,58
	Caulo velho	22,65 \pm 2,41	19,13 \pm 1,75	3,96 \pm 0,54	11,22 \pm 0,73
	Caulo novo	7,86 \pm 2,85	5,43 \pm 0,98	1,64 \pm 0,38	4,76 \pm 1,02
	Folhas	80,61 \pm 4,22	48,82 \pm 4,20	14,47 \pm 0,95	18,74 \pm 0,89
	Total	245,43 \pm 13,64	267,74 \pm 20,14	68,31 \pm 5,44	225,87 \pm 17,14
LC/HN	Raízes	210,34 \pm 23,08	301,51 \pm 20,78	161,76 \pm 12,30	779,94 \pm 38,04
	Caulo velho	33,27 \pm 1,81	42,90 \pm 3,87	21,71 \pm 1,56	75,83 \pm 9,12
	Caulo novo	17,96 \pm 2,43	24,72 \pm 1,51	19,94 \pm 3,49	59,52 \pm 6,76
	Folhas	175,36 \pm 7,85	154,58 \pm 12,65	155,36 \pm 8,06	256,46 \pm 37,99
	Total	436,94 \pm 26,01	523,91 \pm 13,06	358,77 \pm 22,43	1136,90 \pm 28,34
HC/LN	Raízes	150,40 \pm 7,02	189,63 \pm 8,59	54,07 \pm 1,12	176,19 \pm 8,14
	Caulo velho	18,80 \pm 2,22	18,35 \pm 1,82	3,13 \pm 0,17	11,90 \pm 1,22
	Caulo novo	6,81 \pm 1,30	8,04 \pm 1,27	1,79 \pm 0,26	7,03 \pm 0,66
	Folhas	74,34 \pm 7,47	47,06 \pm 3,36	12,78 \pm 0,92	16,43 \pm 1,20
	Total	261,34 \pm 14,50	257,66 \pm 12,61	73,42 \pm 2,64	206,08 \pm 7,70
HC/HN	Raízes	228,39 \pm 13,83	315,41 \pm 17,66	252,90 \pm 15,36	925,36 \pm 32,61
	Caulo velho	28,42 \pm 0,95	40,29 \pm 2,97	23,10 \pm 1,47	81,85 \pm 5,02
	Caulo novo	19,47 \pm 3,35	27,89 \pm 2,22	24,92 \pm 4,63	73,71 \pm 4,97
	Folhas	180,74 \pm 3,91	148,14 \pm 11,51	166,58 \pm 3,11	244,46 \pm 16,16
	Total	451,66 \pm 21,22	531,73 \pm 25,38	455,12 \pm 8,64	1325,39 \pm 33,84

Quadro 7.6. Efeito do fornecimento de N e da exposição ao CO₂ elevado na proporção de N não-marcado nos tecidos relativamente ao N não-marcado total das plantas de *Fraxinus angustifolia* no segundo período vegetativo. Os valores são a média (\pm erro padrão) de seis repetições

Tratamento	Tecido	N Remobilizado	
		Mai	Ago
LC/LN	Raízes	0,53 \pm 0,02	0,70 \pm 0,01
	Caulo velho	0,09 \pm 0,01	0,08 \pm 0,005
	Caulo novo	0,03 \pm 0,01	0,02 \pm 0,005
	Folhas	0,34 \pm 0,02	0,20 \pm 0,01
LC/HN	Raízes	0,48 \pm 0,02	0,57 \pm 0,03
	Caulo velho	0,08 \pm 0,005	0,08 \pm 0,01
	Caulo novo	0,04 \pm 0,005	0,05 \pm 0,005
	Folhas	0,41 \pm 0,02	0,30 \pm 0,03
HC/LN	Raízes	0,61 \pm 0,02	0,72 \pm 0,01
	Caulo velho	0,07 \pm 0,005	0,07 \pm 0,01
	Caulo novo	0,03 \pm 0,005	0,03 \pm 0,005
	Folhas	0,29 \pm 0,01	0,19 \pm 0,01
HC/HN	Raízes	0,50 \pm 0,02	0,59 \pm 0,02
	Caulo velho	0,06 \pm 0,005	0,08 \pm 0,005
	Caulo novo	0,04 \pm 0,01	0,05 \pm 0,005
	Folhas	0,40 \pm 0,01	0,28 \pm 0,02

7.4 Discussão

A elevação da concentração atmosférica de CO₂ pode provocar aumentos das taxas de crescimento das árvores, sobretudo nas primeiras semanas de exposição das plantas (Ceulemans e Mousseau, 1994; Lee e Jarvis, 1995; Norby et al. 1995 e Poorter et

al. 1996). Embora possam persistir diferenças nas dimensões das plantas por períodos superiores a 1 período vegetativo (Ceulemans e Mousseau, 1994), as respostas ao CO₂ elevado não persistem geralmente em ensaios de longo-prazo. O efeito da exposição ao CO₂ elevado verificou-se nos primeiros meses nas plantas de *Fraxinus angustifolia* utilizadas neste ensaio. No entanto, no segundo período vegetativo, após 10 meses de exposição, os efeitos do CO₂ sobre o crescimento só eram perceptíveis nas plantas HN (quadro 7.2), anulando-se após 14 meses de exposição. O mesmo tipo de resposta foi observado em plantas de *Quercus suber* envasadas (Damesin et al. 1996; Pereira e Chaves, 1997). Isto pode resultar do facto de o estímulo do crescimento causado pelo CO₂ elevado nas primeiras idades resultar também numa “aceleração” do desenvolvimento, o que faz com que as plantas maiores estejam mais “adiantadas” no seu desenvolvimento (portanto com taxas de crescimento relativo menores) ainda que tenham a mesma idade cronológica (Coleman et al. 1993; Gebauer et al. 1996).

Assim, não se deve inferir de resultados de ensaios de curta duração, que o CO₂ elevado aumenta a taxa de crescimento das árvores de forma sustentada e, conseqüentemente, a produtividade das florestas. O decréscimo das taxas de crescimento verificado em ensaios envolvendo exposição de longa duração ao CO₂ elevado podem resultar de diferenças de partição da biomassa e/ou de um processo de aclimação da fotossíntese. Ambos os processos assumem grande importância em alterações quer do metabolismo do N, quer da dinâmica interna do N nas plantas. De facto, trabalhando com plantas envasadas de *Quercus suber*, Faria et al (1996) verificou a ocorrência de aclimação fotossintética em plantas expostas a CO₂ elevado durante 14 meses. Verificou também um decréscimo significativo da proteína solúvel, da actividade e da quantidade de Rubisco nas mesmas plantas, em relação às plantas mantidas em CO₂ ambiente. Simultaneamente, verificou-se um aumento dos açúcares solúveis e de amido nas folhas das plantas expostas a CO₂ elevado.

No ensaio presente os efeitos do fornecimento de N no crescimento das plantas foram muito superiores ao efeito do CO₂ elevado. A estrutura das plantas (LAR, R/S) não foi significativamente alterada pelo CO₂ elevado. Em contrapartida, a disponibilidade de N provocou alterações no sentido do investimento nas folhas, sobretudo na Primavera, quando a actividade de crescimento e expansão das folhas é maior. Gebauer et al (1996) refere os efeitos directos do fornecimento de N na partição da biomassa das árvores, podendo o CO₂ elevado afectar indirectamente essa partição através de uma

al. 1996). Embora possam persistir diferenças nas dimensões das plantas por períodos superiores a 1 período vegetativo (Ceulemans e Mousseau, 1994), as respostas ao CO₂ elevado não persistem geralmente em ensaios de longo-prazo. O efeito da exposição ao CO₂ elevado verificou-se nos primeiros meses nas plantas de *Fraxinus angustifolia* utilizadas neste ensaio. No entanto, no segundo período vegetativo, após 10 meses de exposição, os efeitos do CO₂ sobre o crescimento só eram perceptíveis nas plantas HN (quadro 7.2), anulando-se após 14 meses de exposição. O mesmo tipo de resposta foi observado em plantas de *Quercus siber* envasadas (Damesin et al. 1996; Pereira e Chaves, 1997). Isto pode resultar do facto de o estímulo do crescimento causado pelo CO₂ elevado nas primeiras idades resultar também numa “aceleração” do desenvolvimento, o que faz com que as plantas maiores estejam mais “adiantadas” no seu desenvolvimento (portanto com taxas de crescimento relativo menores) ainda que tenham a mesma idade cronológica (Coleman et al. 1993; Gebauer et al. 1996).

Assim, não se deve inferir de resultados de ensaios de curta duração, que o CO₂ elevado aumenta a taxa de crescimento das árvores de forma sustentada e, conseqüentemente, a produtividade das florestas. O decréscimo das taxas de crescimento verificado em ensaios envolvendo exposição de longa duração ao CO₂ elevado podem resultar de diferenças de partição da biomassa e/ou de um processo de aclimação da fotossíntese. Ambos os processos assumem grande importância em alterações quer do metabolismo do N, quer da dinâmica interna do N nas plantas. De facto, trabalhando com plantas envasadas de *Quercus siber*, Faria et al (1996) verificou a ocorrência de aclimação fotossintética em plantas expostas a CO₂ elevado durante 14 meses. Verificou também um decréscimo significativo da proteína solúvel, da actividade e da quantidade de Rubisco nas mesmas plantas, em relação às plantas mantidas em CO₂ ambiente. Simultaneamente, verificou-se um aumento dos açúcares solúveis e de amido nas folhas das plantas expostas a CO₂ elevado.

No ensaio presente os efeitos do fornecimento de N no crescimento das plantas foram muito superiores ao efeito do CO₂ elevado. A estrutura das plantas (LAR, R/S) não foi significativamente alterada pelo CO₂ elevado. Em contrapartida, a disponibilidade de N provocou alterações no sentido do investimento nas folhas, sobretudo na Primavera, quando a actividade de crescimento e expansão das folhas é maior. Gebauer et al (1996) refere os efeitos directos do fornecimento de N na partição da biomassa das árvores, podendo o CO₂ elevado afectar indirectamente essa partição através de uma

aceleração do crescimento das plantas. No entanto, Pereira e Chaves (1997) e Pereira et al (1997) tinham obtido respostas reveladoras de uma interacção positiva entre CO₂ e N em plantas envasadas de *Quercus siber*, embora Lloyd e Farquhar (1996) refiram que esse tipo de respostas não são as mais frequentes.

Uma vez que tanto o crescimento como a partição de biomassa foram sobretudo afectadas pela disponibilidade de N e pelo estado nutricional das plantas, a remobilização de N armazenado nas plantas não foi afectada pela exposição ao CO₂ elevado. Os resultados da remobilização do N indicam uma forte contribuição do N remobilizado para o crescimento das folhas, sobretudo na Primavera, e posteriormente, uma acumulação de N nas raízes no Verão. O padrão de remobilização é semelhante nas plantas HN e LN e indica que as raízes poderão funcionar como locais de acumulação de N durante o Inverno. Resultados semelhantes foram encontrados por Marmann et al (1997) em plantas envasadas de *Fraxinus excelsior*, embora a contribuição do N remobilizado para o crescimento das folhas seja inferior à verificada nas plantas de *Fraxinus angustifolia* utilizadas neste ensaio. Também Millard (1993) quantificou contribuições do N remobilizado em *Fraxinus excelsior* da ordem de 21-40%, inferiores aos valores verificados neste ensaio. A contribuição percentual do N remobilizado para o crescimento das folhas é semelhante à encontrada noutra espécie caducifólias, nomeadamente, 45-60% em *Acer pseudoplatanus* (Millard e Proe, 1991) e 48-76% em *Betula pendula* (Wendler e Millard, 1995).

Pode concluir-se que (1) a exposição ao CO₂ elevado teve como efeito um pequeno incremento do crescimento das plantas de *Fraxinus angustifolia* numa primeira fase (primeiras semanas de exposição) que se anulou no final do segundo período vegetativo; (2) a disponibilidade do N sobrepôs-se largamente ao CO₂ elevado tanto no crescimento das plantas como na partição de biomassa (3) a exposição ao CO₂ elevado não alterou a contribuição da remobilização de N para o crescimento das plantas de *Fraxinus angustifolia*.