



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

PATRÍCIA JULIANA LOPES OLIVEIRA

**RESPOSTAS ECOFISIOLÓGICAS DE MUDAS DE ESPÉCIES
ARBÓREAS NEOTROPICAIS AO ESTRESSE LUMINOSO:
EFEITO DO DOADOR DE ÓXIDO NÍTRICO LIVRE E
NANOENCAPSULADO**

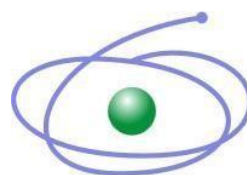
Londrina
2019



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



CAPES

PATRÍCIA JULIANA LOPES OLIVEIRA

**RESPOSTAS ECOFISIOLÓGICAS DE MUDAS DE ESPÉCIES
ARBÓREAS NEOTROPICAIS AO ESTRESSE LUMINOSO:
EFEITO DO DOADOR DE ÓXIDO NÍTRICO LIVRE E
NANOENCAPSULADO**

PATRÍCIA JULIANA LOPES OLIVEIRA

**RESPOSTAS ECOFISIOLÓGICAS DE MUDAS DE ESPÉCIES
ARBÓREAS NEOTROPICAIS AO ESTRESSE LUMINOSO:
EFEITO DO DOADOR DE ÓXIDO NÍTRICO LIVRE E
NANOENCAPSULADO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Biodiversidade e Conservação de Habitats Fragmentados).

Orientador: Prof. Dr. Halley Caixeta de Oliveira

Coorientadora: Profa. Dra. Amedea Barozzi Seabra

Londrina
2019

Lopes-Oliveira, Patrícia Juliana.

Respostas ecofisiológicas de mudas de espécies arbóreas neotropicais ao estresse

luminoso: efeito do doador de óxido nítrico livre e nanoencapsulado / Patrícia Juliana Lopes-Oliveira. - Londrina, 2019.

97 f. : il.

Orientador: Halley Caixeta Oliveira.

Coorientador: Amedea Barozzi Seabra.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, 2019.

Inclui bibliografia.

1. Estresse oxidativo - Tese. 2. Fotoinibição - Tese. 3. Nanotecnologia - Tese. 4. Viveiro - Tese. I. Oliveira, Halley Caixeta. II. Seabra, Amedea Barozzi. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. IV. Título.

PATRÍCIA JULIANA LOPES OLIVEIRA

**RESPOSTAS ECOFISIOLÓGICAS DE MUDAS DE ESPÉCIES
ARBÓREAS NEOTROPICAIS AO ESTRESSE LUMINOSO:
EFEITO DO DOADOR DE ÓXIDO NÍTRICO LIVRE E
NANOENCAPSULADO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Biodiversidade e Conservação de Habitats Fragmentados).

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Prof. Dr. Halley Caixeta de
Oliveira
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Amedea Barozzi Seabra
Universidade Federal do ABC - UFABC

Prof. Dr. Edmilson Bianchini
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Orientador: Prof. Dr. Luciano Freschi
Universidade de São Paulo - USP

Londrina, 25 de fevereiro de 2019.

Ao meu marido Marcos, que sempre me deu coragem para seguir os meus sonhos e nunca me deixou desistir.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Halley Caixeta de Oliveira não só pela constante orientação neste trabalho, mas sobretudo pela compreensão, disponibilidade e incentivo;

À minha coorientadora Profa. Dra. Amedea Barozzi Seabra pela orientação e incentivo constante;

Ao Prof. Dr. José Antônio Pimenta e Dr. Artur Rondina pela disponibilidade e pelas considerações na qualificação;

Ao Prof. Dr. Luciano Freschi e Prof. Dr. Edmilson Bianchini pela disponibilidade para a banca de defesa;

Aos amigos do laboratório de Ecofisiologia Vegetal (LEFIV): Tatiane Debiasi, Jéssica Mandelli, Natália Souza, Mariana Hertel, Lara Bardy, Anderson Calzavara, Diego Gomes, Karina Sanada, Lorena Iastrenski, Juliana Rocha e Angélica Tiepo por todos os momentos compartilhados, pelas risadas e piadas ruins, pela ajuda nas análises, dúvidas e desmontagens dos experimentos, pela amizade e incentivo ao longo do desenvolvimento deste trabalho;

À Milena Trevisan Pelegrino pelas nanoformulações e análises realizadas na UFABC, pelas ideias ao longo do desenvolvimento deste trabalho e pelo apoio;

À Universidade Estadual de Londrina não só pelo espaço disponibilizado para a realização dos experimentos e análises, mas também pela formação;

Aos meus pais pelo incentivo, amor e compreensão por toda a minha vida;

Ao meu marido Marcos que esteve sempre ao meu lado, me incentivando, comemorando as vitórias, compreendendo os momentos de dificuldade e me levantando sempre que eu caía e achava que não era capaz de me levantar. Por todo amor, apoio e incentivo ao longo da minha caminhada acadêmica;

Aos amigos da graduação e de Arapongas, sempre presentes nos momentos de comemoração e descontração;

Ao meu irmão Marcos, às minhas cunhadas Bárbara e Angela, minha sogra Norma e aos meus sobrinhos Marco Antônio e Eduardo pelos momentos de descontração, amizade e apoio;

A todos os professores que participaram da minha formação acadêmica ao longo dos anos. Este trabalho teve participação de todos vocês. Muito obrigada!

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de

Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

LOPES-OLIVEIRA, Patrícia Juliana. **Respostas ecofisiológicas de mudas de espécies arbóreas neotropicais ao estresse luminoso**: efeito do doador de óxido nítrico livre e nanoencapsulado. 2019. 97 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

RESUMO

Áreas desflorestadas apresentam condições microclimáticas muito distintas das encontradas em florestas e o plantio de mudas em programas de reflorestamento surge como uma alternativa para amenizar o processo de perdas na biodiversidade destas áreas. Contudo, o excesso de luz incidente nestas áreas provoca nas mudas danos oxidativos e fotoinibição. O processo de rustificação no viveiro, em que as mudas são expostas à luz solar direta, visa favorecer seu estabelecimento e desenvolvimento após o plantio. Este processo propicia o desenvolvimento de características e mecanismos de fotoproteção pelas plantas, que podem ser mediados por moléculas de sinalização, como o óxido nítrico (NO). Pesquisas demonstram a eficiência do NO na indução de resposta nas plantas contra estresses abióticos como seca, salinidade, metais pesados e temperaturas extremas. Porém, o tratamento direto das plantas com NO é difícil devido a sua natureza gasosa e sua curta meia vida. Sendo assim, as nanopartículas (NPs) carreadoras de doadores de NO surgem como uma alternativa que visa proteger essa molécula da degradação, permitindo uma liberação controlada de NO, ampliando seu período de ação e viabilizando sua aplicação em condições de campo. Buscando melhorar a qualidade de mudas usadas em reflorestamentos, os objetivos deste trabalho foram: analisar as respostas de mudas de *Heliocarpus popayanensis* Kunth e *Cariniana estrellensis* (Raddi) Kuntze submetidas ao processo de rustificação sob sol pleno e comparar estas respostas com as mudas mantidas sob sombreamento; e verificar o efeito da utilização de doador de NO, na forma livre e encapsulado em NPs de quitosana, na aclimação destas mudas ao estresse luminoso. Os objetivos foram investigados por meio da avaliação de parâmetros morfológicos, fisiológicos e bioquímicos das mudas. Com a rustificação, as mudas de ambas as espécies exibiram respostas indicativas de maior qualidade, como a redução da área foliar específica e das razões altura/diâmetro e parte aérea/raiz, e aumento no índice de qualidade de Dickson. Além disso, nenhuma das espécies sofreu de fotoinibição crônica, indicando que ambas foram capazes de se proteger do excesso de luz. Em resposta ao estresse luminoso, a espécie *H. popayanensis* desenvolveu folhas menores e mais espessas, aumentou a fotossíntese líquida (*A*), a condutância estomática e a eficiência instantânea de carboxilação, além do aumento nos parâmetros bioquímicos associados à resposta antioxidante, como a atividade da enzima superóxido dismutase nas folhas e os níveis foliares de fenóis, flavonóides e NO. As plantas desta espécie tratadas com NPs contendo o ácido S-nitroso-mercaptossuccínico (S-nitroso-MSA), um doador de NO, apresentaram aumento da área foliar, comprimento da parte aérea, diâmetro do caule e massa seca de raiz, caule e folhas, além de diminuição dos níveis foliares de fenóis. Esses efeitos não foram induzidos pelo tratamento com o doador de NO não encapsulado. Já *C. estrellensis* apresentou maior diâmetro do caule e menores níveis de carotenóides em resposta ao estresse luminoso. As mudas dessa espécie não aumentaram sua *A*, porém houve aumento da transpiração e queda na eficiência no uso da água após a transferência ao sol pleno. Não foi evidenciada a indução da síntese de NO e de

respostas antioxidantes em folhas desta espécie sob estresse luminoso, indicando que esta deve dispor de diferentes mecanismos para a aclimação que ainda precisam ser investigados. Além disso, para *C. estrellensis*, não foram observados efeitos do tratamento com S-nitroso-MSA livre ou encapsulado, indicando que a resposta da espécie ao excesso de luz não deve ser mediada pelo NO. Esses resultados indicam que o processo de rustificação à alta irradiância estimulou diferentes respostas entre as espécies estudadas, mesmo que as mudas das duas espécies tenham sido capazes de se aclimatar às novas condições de luminosidade. Estas adquiriram características de tolerância, que provavelmente favoreceriam seu estabelecimento após o plantio no campo. As mudas de *H. popayanensis* apresentaram maior plasticidade em relação à luz que *C. estrellensis*. Além disso, a aplicação de NP contendo S-nitroso-MSA afetou positivamente o crescimento apenas das mudas de *H. popayanensis*, indicando um possível envolvimento do NO na resposta dessa espécie a altas irradiâncias.

Palavras-chave: Estresse oxidativo. Fotoinibição. Nanotecnologia. S-nitrosotiol. Viveiro.

LOPES-OLIVEIRA, Patrícia Juliana. **Echophysiological responses of neotropical tree species seedlings to high-light stress: free and nanoencapsulated nitric oxide donor effects.** 2019. 97 p. Dissertation (Master's degree in Biological Sciences) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

ABSTRACT

Deforested areas present very distinguished microclimatic conditions than forests. The reforestation program rises as an alternative to reduce the biodiversity loss. However, the high-light incidence in these areas causes oxidative damage and photoinhibition to the seedlings. The hardening process in nursery, where the seedlings are exposed to direct sunlight, favors its establishment and development after planting in the field. This process favors the development of characteristics and photoprotection mechanisms of plants, which can be mediated by signaling molecules such as nitric oxide (NO). Researches show the NO efficiency against abiotic stress such as drought, salinity, heavy metals and extreme temperatures. But, the NO direct treatment to plants is complicated due to its gas nature and short half-life. Hence, the nanoparticles (NPs) carrying NO donors' rise as an alternative that seek to protect these molecules from decomposition, enabling a NO controlled release, amplifying its action period and making its non-controlled conditions field applications feasible. Seeking a better perspective for reforest seedlings utilization, the present study objectives were: analyze *Heliocarpus popayanensis* Kunth and *Cariniana estrellensis* (Raddi) Kuntze seedlings responses submitted to the full sun hardening process and compare these with seedlings kept under shading; and verify the nitric oxide donor utilization effect both in free form and encapsulated in chitosan NPs into these seedlings' acclimation submitted to high-light stress. The objectives were investigated through morphological, physiological and biochemical parameters evaluation. With rustification, both seedlings species presented positive effects into quality indication variables, such as the reduction of specific leaf area, height/stem diameter and shoot to root dry mass ratio and Dickson quality index increase. Beyond that, no species suffered chronic photoinhibition, indicating that both were capable to protect themselves against light excess. In response to high-light stress, *H. popayanensis* seedlings developed smaller thicker leaves, increased photosynthesis (*A*), stomatal conductance and carboxylation efficiency, besides the biochemical parameter increase responsible for antioxidant response, such as dismutase superoxide enzyme activity, phenols, flavonoids and NO foliar levels. This specie plants treated with NPs containing S-nitrosomercaptosuccinic acid (S-nitroso-MSA), an NO donor, presented increased leaf area, shoot length, stem diameter and root, stem and leaves dry mass, besides the decrease in phenol foliar levels. These effects were not induced by the non-encapsulated NO donor treatment. *C. estrellensis* seedlings presented larger stem diameter and lower carotenoid levels in response to high-light stress. These species' seedlings did not increase its *A*, however, transpiration increased and water use efficiency decreased after the exposure to full sun. It was not evidenced the induction of NO synthesis and antioxidant responses in leaves of this species under high-light stress, indicating that its acclimation must regard on different mechanisms which need to be investigated. Besides that, for *C. estrellensis* no effects of S-nitroso-MSA free form or encapsulated treatment were observed of any kind, indicating that the specie response to high-light should not be NO mediated. These results indicate that the rustification to high

irradiance stimulated different responses among the studied species, even though the seedlings of the two species were able to acclimate to the new light conditions. They acquired tolerance characteristics, which probably would favor its establishment after planting in the field. *H. popayanensis* showed more plasticity to the new luminosity condition. Furthermore, the NP containing S-nitroso-MSA application positively affected *H. popayanensis* seedling's growth, indicating a possible involvement of NO in this specie's response to high irradiance.

Key words: Nanotechnology. Nursery. Oxidative stress. Photoinhibition. S-nitrosothiol.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	10
FRAGMENTAÇÃO FLORESTAL E REFLORESTAMENTO	10
INTENSIDADE LUMINOSA, ACLIMATAÇÃO E QUALIDADE DE MUDAS.....	12
ÓXIDO NÍTRICO E NANOTECNOLOGIA	17
OBJETIVOS	23
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	24
CAPÍTULO 1 - Respostas bioquímicas e morfofisiológicas de mudas das espécies arbóreas neotropicais <i>Heliocarpus popayanensis</i> Kunth e <i>Cariniana estrellensis</i> (Raddi) Kuntze ao estresse luminoso.....	39
INTRODUÇÃO	41
MATERIAL E MÉTODOS	43
LOCAL DE ESTUDO, ESPÉCIES E CONDIÇÕES DE CULTIVO	43
AVALIAÇÕES MORFOLÓGICAS.....	45
AVALIAÇÕES FISIOLÓGICAS.....	45
AVALIAÇÕES BIOQUÍMICAS	46
ANÁLISE ESTATÍSTICA	49
RESULTADOS	50
DISCUSSÃO	55
CONCLUSÃO	61
REFERÊNCIAS	63

CAPÍTULO 2 - Efeito do doador de óxido nítrico encapsulado em nanopartículas de quitosana sobre mudas das espécies arbóreas neotropicais <i>Heliocarpus popayanensis</i> Kunth e <i>Cariniana estrellensis</i> (Raddi) Kuntze submetidas à aclimação a pleno sol	72
1. INTRODUÇÃO	74
2. MATERIAL E MÉTODOS	76
2.1 LOCAL DE ESTUDO.....	76
2.2 ESPÉCIES E CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS.....	76
2.3 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS.....	77
2.4 PREPARO DAS FORMULAÇÕES E NANOPARTÍCULAS.....	77
2.5 TRATAMENTO DAS PLANTAS COM AS NANOFORMULAÇÕES.....	78
2.6 AVALIAÇÕES MORFOLÓGICAS	78
2.7 AVALIAÇÕES FISIOLÓGICAS	79
2.8 AVALIAÇÕES BIOQUÍMICAS	79
2.9 CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO DO S-NITROSO-MAS.....	80
2.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA	80
3. RESULTADOS	81
4. DISCUSSÃO	86
5. CONCLUSÃO.....	90
6. PERSPECTIVAS	91
7. REFERÊNCIAS.....	92

INTRODUÇÃO GERAL

FRAGMENTAÇÃO FLORESTAL E REFLORESTAMENTO

As florestas representam os componentes mais importantes dos ecossistemas tropicais, uma vez que são as grandes responsáveis pela preservação do “pool” de genes, pelo papel no ciclo global do carbono, pela mitigação dos aumentos de CO₂ atmosférico e pela grande fonte de biomassa e bioenergia renováveis (Favaretto et al., 2011). As florestas tropicais úmidas, apesar de ocupar apenas 7% da superfície terrestre, são os ambientes terrestres mais ricos em biodiversidade, abrigando mais de 50% do total de espécies do planeta (Myers et al., 2000). Entre elas está a Mata Atlântica brasileira, que compreende a segunda maior floresta pluvial do continente americano, abrigando aproximadamente 8.000 espécies de plantas endêmicas, dentre as quais muitas estão ameaçadas de extinção (Myers et al., 2000; Tabarelli; Gascon, 2005).

A Mata Atlântica representa uma região heterogênea, incluindo uma ampla variedade de fitofisionomias e composições florestais, com ecossistemas que atualmente se limitam a fragmentos florestais de diferentes tamanhos distribuídos irregularmente devido à intensa ação antrópica (Soares; Medri, 2002). Apesar de ser uma das regiões sul-americanas que possuem o maior número de áreas de proteção integral, os números ainda são insuficientes e o sistema não é adequado, visto que as áreas protegidas cobrem menos de 2% de todo o bioma. As áreas de proteção integral protegem apenas 24% dos remanescentes, além do fato de que muitas dessas áreas são pequenas demais para garantir a persistência de espécies em longo prazo (Silva; Tabarelli, 2000).

Segundo Galindo-Leal; Câmara (2003), mais de 93% da faixa original da floresta desapareceu, o que a coloca na posição de uma das florestas tropicais mais ameaçadas do mundo (Fundação SOS Mata Atlântica, 2015). Ainda, de acordo com o relatório anual 2015 da Fundação SOS Mata Atlântica, atualmente restam somente 8,5% de remanescentes florestais acima de 100 hectares. Somados todos os fragmentos de floresta nativa acima de 3 hectares, tem-se atualmente 12,5% de remanescentes.

A prática de restauração ecológica vem sendo muito utilizada para restabelecer a diversidade perdida do ambiente e reverter ou desacelerar o processo de perdas na

biodiversidade (Lamb, 2001; Fahrig, 2003; Williams, 2011). Essa prática consiste em ações que buscam iniciar ou acelerar processos naturais de regeneração, recuperando as propriedades do ecossistema degradado, incluindo possíveis interações ecológicas (Williams, 2011).

O reflorestamento com plantio de mudas de espécies de diferentes estádios sucessionais é uma das técnicas mais utilizadas na recuperação de ambientes degradados (Glufke et al., 1999), sendo também o método mais comum de reflorestamento no Brasil (Botelho; Davide, 2002). Os plantios florestais têm vários objetivos, que incluem proteção e melhoria do solo, sequestro de carbono e a restauração ecológica (Cortina et al., 2013). O plantio de espécies lenhosas contribui para melhorar os processos dos ecossistemas por intermédio da redução da energia cinética das gotas de chuva sobre o solo, da formação de serrapilheira, do aumento da infiltração de água no solo, da redução de enxurradas, da transferência de nutrientes da atmosfera e de horizontes profundos do solo para as camadas superficiais do mesmo, da produção de frutos comestíveis, do estoque de carbono e da modulação das oscilações climáticas (Benayas et al., 2009; Allen et al., 2010).

Contudo, múltiplos fatores podem dificultar o sucesso dos reflorestamentos. Entre eles, pode-se destacar a uniformidade na estrutura da vegetação, a baixa diversidade de espécies em relação ao estado anterior à degradação, a perda de indivíduos pouco adaptados e até mesmo a juventude dos reflorestamentos em relação à escala de tempo dos processos ecológicos envolvidos (Gandolfi; Rodrigues, 2007). Dentre as vantagens do plantio de mudas, é possível destacar a garantia da densidade de plantio, a alta sobrevivência e o espaçamento regular obtido, facilitando os tratos silviculturais. Nestes casos, a qualidade morfofisiológica das mudas pode garantir seu crescimento inicial e sua sobrevivência, de forma que o plantio de mudas com baixa qualidade pode ser responsável pela alta mortalidade, elevando o custo de implantação, além de comprometer o crescimento da floresta (Botelho; Davide, 2002).

Com o aumento das exigências legais e a discussão sobre a necessidade de recuperar áreas degradadas, existe uma maior demanda por mudas de espécies arbóreas nativas da Mata Atlântica, o que leva a um crescente interesse em pesquisas com estas espécies (Keller et al., 2009). Entretanto, os custos dos programas de restauração são altos devido à necessidade do replantio das mudas, já que estas apresentam elevada mortalidade no campo. Um dos motivos para esse alto índice de mortalidade das mudas é a pouca atenção dada às exigências ecofisiológicas das

plantas nativas (Cunha et al., 2005).

INTENSIDADE LUMINOSA, ACLIMATAÇÃO E QUALIDADE DE MUDAS

Inúmeros fatores influenciam o desempenho das plantas a curto e longo prazo (Walter et al., 2007). Fatores ambientais, como precipitação anual, sazonalidade, intensidade e qualidade luminosas e fertilidade do solo modulam as características morfológicas e fisiológicas das plantas (Cornwell; Ackerly, 2009). A luz é fundamental para o crescimento das plantas, não apenas por prover energia para a fotossíntese, mas também por prover sinais que regulam seu desenvolvimento mediante fotorreceptores sensíveis a diferentes intensidades e qualidades espectrais (Zanella et al., 2006). Assim, a luz é um dos recursos mais limitantes no estabelecimento e crescimento de espécies arbóreas em florestas tropicais (Tognetti et al., 1994; Lee et al., 1997; Smith; Whitelam, 1997; Rijkers et al., 2000; Rozendaal et al., 2006; Lambers et al., 2008; Jiang et al., 2011), de modo que a distribuição das plantas pode estar relacionada à sua capacidade de sobreviver em diferentes níveis de radiação solar (Givnish, 1988; Osunkoya et al., 1994).

As plantas que dispõem de elevada plasticidade morfofisiológica são capazes de se aclimatar aos diferentes níveis de radiação solar no ambiente por alterações anatômicas, morfológicas e fisiológicas (Pandey; Kushwaha, 2005; Oguchi et al., 2005; Warren et al., 2007). Estas respostas podem variar desde uma aclimatação imediata, basicamente fisiológica, até um ajuste morfoanatômico em longo prazo (Valladares; Pearcy, 1997; Silvertown, 1998). Os ajustes fenotípicos para a aclimatação das plantas a diferentes intensidades luminosas atuam, essencialmente, na regulação da fotossíntese dentro dos limites genéticos específicos, permitindo manter um balanço positivo de assimilação de carbono (Kitajima, 1994; Krause et al., 2001).

A aclimatação das plantas ao aumento da intensidade luminosa propicia a diferenciação de folhas típicas de sol (Murchie; Horton, 1997), as quais apresentam parênquima paliádico mais espesso, área foliar específica reduzida, maior concentração de nitrogênio por área foliar, menores níveis de clorofila por unidade de massa foliar (com maior empobrecimento de clorofila *b*), maiores densidade estomática, níveis de ribulose bisfosfato carboxilase/oxigenase (Rubisco) e de transportadores fotossintéticos de elétrons por unidade de área foliar, além de maior

ponto de compensação luminoso, da indução de enzimas antioxidantes, do aumento da razão raiz/parte aérea e dos níveis de pigmentos fotoprotetores, como carotenoides (Adams et al., 2004; Walters, 2005; Portsmuth; Niinemets, 2007; Favaretto et al., 2011; Jiang et al., 2011; Martins et al., 2013; Calzavara et al., 2015; Mazzanatti et al., 2016). Por conta destas características, as folhas de sol apresentam maior tolerância à alta luminosidade, uma vez que proporcionam altas taxas de assimilação de carbono e possuem melhor capacidade de dissipação do excesso de energia luminosa, enquanto folhas de sombra são mais susceptíveis aos danos provocados pelo excesso de luz (Demmig-Adams; Adams, 1992).

O grau de resposta das plantas ao aumento da luminosidade varia entre as espécies em função de sua tolerância à sombra (Cano et al., 2011). Espécies pioneiras ou intolerantes à sombra tendem a apresentar maior plasticidade na produção de folhas e na taxa fotossintética, quando comparadas com espécies tardias ou tolerantes à sombra (Givnish, 1988; Ishida et al., 1999; Portsmuth; Niinemets, 2007). Contudo, espécies não-pioneiras ou tolerantes à sombra podem também apresentar certa capacidade de se aclimatar ao sol pleno (Yamashita et al., 2002).

Ambientes com sombra profunda são prejudiciais para a fotossíntese; todavia, a exposição ao sol pleno também pode limitar o crescimento e a sobrevivência das plantas (Valladares et al., 2002; Lusk et al., 2008). Sob intensidades luminosas elevadas, a energia da luz interceptada pelas folhas pode ultrapassar os requisitos do maquinário fotossintético, fazendo com que o centro de reação do fotossistema II seja inativado, constituindo um fenômeno denominado fotoinibição (Baker, 1996; Malnoë, 2018). Esta pode ser dinâmica ou crônica (Matos et al., 2009; Moraes et al., 2010). A fotoinibição dinâmica é reversível e está relacionada à dissipação térmica do excesso de energia absorvida, indicando que a redução na eficiência fotoquímica é um resultado dos mecanismos de fotoproteção (Thiele et al., 1996). Em contrapartida, a fotoinibição crônica está associada à formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) e à ocorrência de danos ao aparelho fotossintético (Asada, 1999; Mittler, 2002; Adams et al., 2004; Asada, 2006). Essas ERO, como ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radicais hidroxilas (OH^{\cdot}) e oxigênio singleto (1O_2), são extremamente reativas e, na inexistência de um mecanismo protetor, podem interromper ou afetar o metabolismo normal, provocando peroxidação lipídica e danos oxidativos aos lipídios, proteínas e ácidos nucleicos (Rout; Shaw, 2001; Moraes et al., 2010; Esringu et al., 2016). Condições que limitam a fixação de CO_2 , como os

estresses por déficit hídrico, sal, calor e frio, ou pela combinação destas condições com a alta luminosidade, provocam um aumento na produção de ERO nas células vegetais (Miller et al., 2008).

Por ser um fenômeno comum nos trópicos (Houter; Pons, 2005), onde a densidade de fluxo de fótons fotossintéticos alcança níveis acima de $1800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Larcher, 2003), a fotoinibição é sobretudo relevante no planejamento do reflorestamento dessas áreas (Calzavara et al., 2015). Levando em consideração que as mudas são cultivadas em viveiros florestais sob condições bem irrigadas (Maruyama et al., 2005) e quando são transferidas para o campo se tornam expostas, não só à alta intensidade luminosa (Favaretto et al., 2011), como também a outros fatores estressantes, como déficit hídrico e altas temperaturas, há grande chance dessas mudas sofrerem fotoinibição (Alves et al., 2002). Visto que as plantas de sombra dispõem de características que as tornam mais susceptíveis à luz, à seca e ao calor, no caso de uma súbita exposição destas à alta irradiância (Lovelock et al., 1994), a longa exposição a elevadas intensidades luminosas no campo pode ser prejudicial, resultando, em muitos casos, na morte dessas plantas (Powles, 1984; Demmig-Adams; Adams, 1992). Conseqüentemente, plantas cultivadas desta forma devem apresentar estabelecimento insatisfatório em áreas abertas, caso não passem antes pelo processo de rustificação (Mattsson, 1997).

Por terem menor susceptibilidade à fotoinibição, mudas de espécies pioneiras são mais propensas a se aclimatar à alta irradiância do que espécies intermediárias ou tardias da sucessão (Favaretto et al., 2011). Assim, a capacidade de lidar com a fotoinibição varia entre as diferentes espécies vegetais (Krause et al., 1995; Kitao et al., 2006). O conhecimento acerca da capacidade de aclimação de uma espécie a diferentes condições luminosas e sua vulnerabilidade à fotoinibição é importante, já que as espécies de plantas precisam competir entre si por espaço e recursos limitados (Krause et al., 2001).

As florestas maduras apresentam condições microclimáticas muito distintas das encontradas em áreas desflorestadas (Craven et al., 2011), as quais são caracterizadas por maiores intensidades luminosas, temperatura do ar e do solo, elevado déficit de pressão de vapor e grandes flutuações sazonais no potencial de água no solo (Guariguata; Ostertag, 2001). Portanto, as mudas transplantadas para essas áreas estão expostas a diferentes tipos e intensidades de fatores estressantes, afetando aspectos morfofisiológicos, em maior ou menor grau, dependendo da

capacidade de aclimatação de cada espécie (Griscom et al., 2005). Diante disso, a rustificação visa possibilitar que as mudas respondam melhor às condições adversas encontradas em campo, incluindo a elevada intensidade luminosa, resultando em uma maior qualidade das mudas e uma diminuição no número de replantios (Guo et al., 2006; Tatagiba et al., 2007; D'avila et al., 2011). Por conta disso, são necessários estudos que determinem as características morfológicas e fisiológicas das mudas, visto que estes podem auxiliar na previsão dos elementos que beneficiam a sobrevivência e o desenvolvimento inicial das mudas em campo, conquistando dessa forma o sucesso dos plantios com árvores nativas e, conseqüentemente, uma melhor perspectiva nos programas de reflorestamento.

Após o plantio, muitas mudas de espécies lenhosas apresentam problemas de sobrevivência e crescimento (Jacobs et al., 2004). Surgiu, deste modo, a necessidade de produção de mudas com qualidades que aumentem seu estabelecimento em campo (Mattsson, 1997). No decorrer das últimas décadas, a melhoria na qualidade das mudas empregadas em plantios florestais aumentou significativamente suas taxas de sobrevivência e de crescimento inicial após o plantio (Cortina et al., 2013).

Devido à escassez de reservas durante a fase de muda, as plantas são mais suscetíveis a estresses ambientais e não são capazes de amortecer a deficiência de determinados recursos ambientais e de estimular seu desenvolvimento (Walter et al., 2007). O choque de transplante, caracterizado pelo crescimento reduzido e baixa sobrevivência durante o período de aclimatação às novas condições ambientais, é enfrentado pelas mudas logo após o plantio no campo (Nambiar; Sands, 1993). Para amenizar este choque, é essencial que essas mudas sejam produzidas em ambientes que apresentem características específicas e parcialmente controladas, como em viveiros, onde as mudas de espécies arbóreas passam por várias etapas até serem destinadas ao plantio em campo. A primeira etapa abrange o tempo de semeadura e germinação, seguida da repicagem e transferência das mudas para um setor de crescimento, permanecendo sob sombreamento moderado. A última etapa compreende a rustificação das mudas, em que são expostas à luz solar direta (Zamith; Scarano, 2004). Caso sobrevivam à fotoinibição e aos danos fotooxidativos, a morfologia e fisiologia das mudas começam a mudar, assemelhando-se àquelas apresentadas pelas plantas de sol (Claussen, 1996). Assim, o processo de rustificação no viveiro favorece a sobrevivência e o desenvolvimento apropriado dos indivíduos nas condições adversas encontradas em campo após o plantio (Gomes et al., 2002;

Davis; Jacobs, 2005; Mendoza-Bautista et al., 2011).

A identificação de mudas de alta qualidade é bastante dificultada pela heterogeneidade do ambiente de destino, visto que as mudas mais adequadas para uma determinada área e tempo de plantio podem não ser ideais para outras condições ambientais (Cortina et al., 2013). Por conta da grande variabilidade do manuseio, do local de plantio e das condições climáticas, é importante reconhecer que os atributos que podem ser medidos no viveiro são apenas parcialmente relacionados com o desempenho em campo (Mattsson, 1997). Contudo, os custos de replantio após perdas causadas pela má qualidade das mudas são tão significativos que a identificação de uma pequena quantidade de mudas com baixo potencial de crescimento já é o bastante para que um programa de controle compense e traga benefício de custo aos produtores (Mattsson, 1997).

O método mais comum e de fácil utilização para prognosticar a qualidade de uma muda é a avaliação de suas variáveis morfológicas (Davis; Jacobs, 2005), como altura da parte aérea, diâmetro do caule, área foliar, razão altura/diâmetro, massa seca da parte aérea, massa seca da raiz, razão massa seca da parte aérea/raiz e o índice de qualidade de Dickson, que é calculado pela massa seca total dividida pela soma das razões massa seca da parte aérea/massa seca da raiz e altura da parte aérea/diâmetro do colo ($IQD = MST / (RAD + RPAR)$) (Mattsson, 1997). É essencial que diversas variáveis sejam analisadas para avaliar a qualidade em mudas. Reconhecer uma única característica como indicadora do sucesso do estabelecimento das mudas no campo não é efetivo (Jacobs et al., 2005). Mediante o estudo das interações destes parâmetros com cada fator ambiental, em particular, e/ou estágio de desenvolvimento da planta, podem ser conhecidos a eficiência do crescimento e o potencial de aclimação às condições ambientais nas quais estas plantas são submetidas (Peixoto; Peixoto, 2009).

Em viveiros, a altura da parte aérea e o diâmetro do colo são bastante utilizados para avaliar a qualidade das mudas, posto que estas variáveis foram correlacionadas, em alguns casos, com a sobrevivência e crescimento após o plantio no campo, além de serem de fácil mensuração (Jacobs et al., 2005). Mudanças com maior diâmetro suportam melhor os danos físicos (Cleary et al., 1978), além de disporem de mais nutrientes e carboidratos armazenados (Johnson et al., 2009), os quais estão disponíveis para suprir a demanda das plantas (Salifu; Timmer, 2003) até que o contato entre raiz e solo seja estabelecido para explorar os recursos disponíveis no

local de plantio (Jacobs et al., 2005). Para as espécies intolerantes à sombra, estudos sugerem que esta influencia negativamente ambas as variáveis, porém, o diâmetro do caule é mais afetado do que a altura, reduzindo assim a razão altura/diâmetro (Petritran et al., 2009). Contudo, estas espécies podem crescer em altura como resposta ao sombreamento, sendo esse crescimento relacionado à síndrome de escape à sombra apresentada por essas espécies (Henry; Aarssen, 2001; Taugourdeau et al., 2011; Valladares et al., 2012). Diante disso, é necessário cuidado ao utilizar somente uma variável como a altura na indicação de qualidade de uma muda (Mattsson, 1997), uma vez que a relação entre o crescimento do caule e seu espessamento pode estar desequilibrada, resultando em mudas de baixa qualidade (Calzavara et al., 2015).

Embora a altura seja um indicador prático da condição física de uma muda, devido à sua correlação com o aumento da biomassa (Singhakumara et al., 2003), um ponto que deve ser observado é como essa biomassa está distribuída (Claussen, 1996). Mudas que, influenciadas pela limitação de luz ou substrato, dispõem de um acúmulo de biomassa voltado à parte aérea, podem ter uma redução na capacidade de seu sistema radicial em suprir água e nutrientes e de armazenar carbono (Vilela et al., 2003; Mendoza-Bautista et al., 2011), o que deve afetar seu desenvolvimento no campo (Moraes et al., 2010). Plantas que passam por um período de aclimatação em ambientes com alta intensidade luminosa investem grande proporção de fotoassimilados ao desenvolvimento da raiz, propiciando maior capacidade de captação de água para suportar as maiores taxas de transpiração e fotossíntese vivenciadas nestes ambientes (Poorter; Nagel, 2000).

Buscando uma forma de unir diversas variáveis para avaliar a qualidade das mudas, foram desenvolvidos índices como o índice de qualidade de Dickson (Dickson et al., 1960), considerando diversos parâmetros empregados na avaliação da qualidade e indicando o equilíbrio da distribuição de biomassa da muda (Fonseca et al., 2002). Este índice foi considerado uma medida morfológica integrada promissora (Johnson; Cline, 1991), mas deve ser melhor explorado, no intuito de se obter valores para indicar qualidade em mudas de diferentes espécies (Leles et al., 2006).

ÓXIDO NÍTRICO E NANOTECNOLOGIA

Como o ambiente natural exhibe um conjunto complexo de condições abióticas

estressantes para as plantas e sua capacidade de responder a esses estresses é altamente flexível e equilibrada através da interação entre moléculas de sinalização, os hormônios vegetais possuem um papel fundamental no processo de aclimação (Freschi, 2013; Asgher et al., 2017). Estes integram uma infinidade de sinais internos e externos em respostas metabólicas e de desenvolvimento coordenadas, que, por sua vez, maximizam a adequação da planta sob diversos contextos ontogenéticos e ambientais, desempenhando papéis reguladores fundamentais na aclimação das plantas às condições de estresse abiótico (Freschi, 2013; Asgher et al., 2017). Para realizar efetivamente tal função, os hormônios vegetais distintos interagem entre si e também com outras substâncias sinalizadoras endógenas (Santner et al., 2009). Entre estas moléculas que interagem com hormônios, o óxido nítrico (NO) vem conquistando grande interesse da comunidade científica (Neill et al., 2003; Wilson et al., 2008; Mur et al., 2013).

O NO é uma espécie reativa de nitrogênio (ERN) que possui um elétron não pareado em seu orbital π , o que o torna uma molécula relativamente instável. Ele possui meia-vida de alguns segundos ($t_{1/2} < 6$ s), e uma alta difusividade ($4,8 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ em H_2O a 20°C , 1 atm), tornando-o uma molécula especial entre as ERN (Sahay; Gupta, 2017). O NO tem a peculiaridade de ser um gás incolor e, devido a sua alta difusividade, é altamente lipofílico, portanto, pode facilmente entrar na fase lipídica das membranas celulares (Sahay; Gupta, 2017).

O NO pode ser originado a partir do próprio indivíduo (NO endógeno) ou ser aplicado exogenamente (Salgado et al., 2013). Foram propostas diversas vias para a síntese e degradação do NO em plantas, apesar de esse ainda ser um tema controverso (Figura 1).

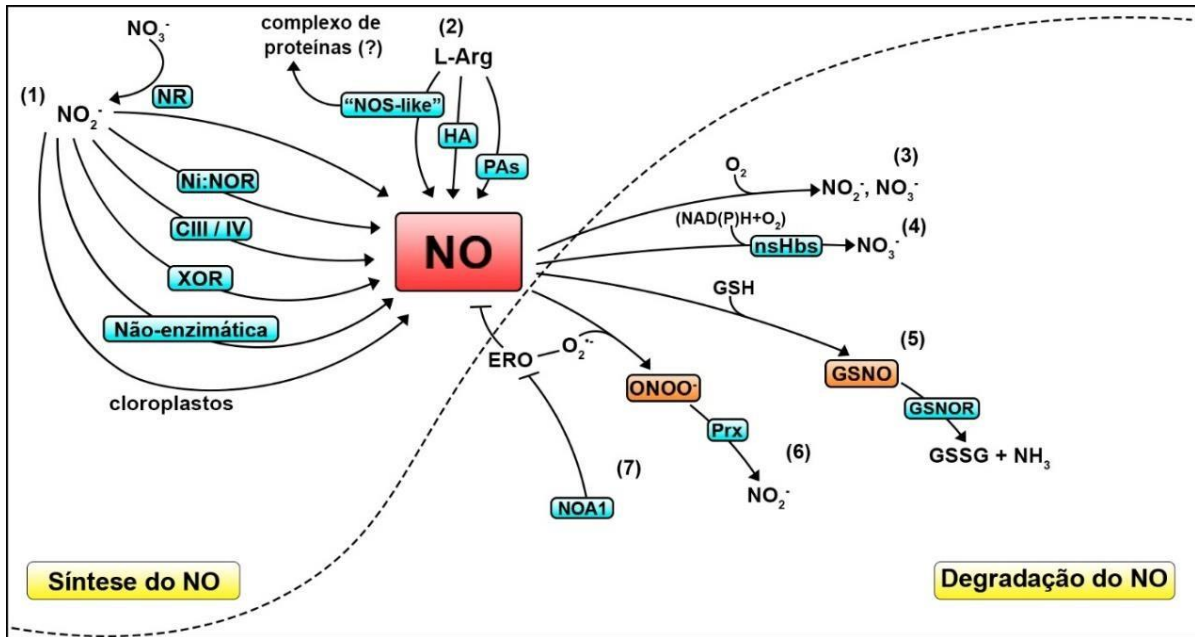


Figura 1 – Rotas propostas para síntese e degradação de NO em plantas, controlando a homeostase do NO. **Síntese do NO:** (1) A produção de NO dependente de nitrito (NO_2^-) nas plantas inclui uma via não enzimática e várias vias enzimáticas envolvendo a ação das nitrato redutases (NR) citosólicas e da membrana plasmática, nitrito-NO redutase (NiNOR), cadeia de transporte de elétrons mitocondrial (CIII / IV), xantina óxido redutase (XOR) e a redução de nitrito em NO pelos transportadores de elétrons de cloroplastos. (2) A via de produção de NO dependente de L-Arginina envolve uma enzima óxido nítrico sintase não identificada (NOS) e duas vias ainda mal caracterizadas usando hidroxilamina (HA) ou poliaminas (PAs) como substratos. **Degradação do NO:** (3) A reação de NO com oxigênio molecular (O_2) leva à produção espontânea de NO_2^- e nitrato (NO_3^-). (4) O NO pode ser convertido a NO_3^- em reação catalisada por hemoglobinas não simbióticas (nsHbs). (5) O NO pode reagir com a glutathiona reduzida (GSH) para formar a S-nitrosoglutationa (GSNO), que, por sua vez, pode ser convertida em GSSG (glutathiona oxidada) e amônia pela ação da GSNO redutase (GSNOR). (6) O NO também pode reagir com superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), resultando na formação de peroxinitrito (ONOO^-), o qual pode ser degradado a NO_2^- por uma peroxirredoxina (Prx). (7) Ao influenciar a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), a proteína NO-ASSOCIATED1 (NOA1) indiretamente impacta os níveis de NO nas plantas. **Adaptado de:** Freschi, 2013 e Salgado et al., 2013.

Diversos estudos demonstram que o NO pode mediar processos bioquímicos relacionados a um amplo espectro de eventos fisiológicos, modulando ações hormonais, interagindo com espécies reativas de oxigênio e modificando a expressão gênica e a atividade proteica nos vegetais (Simontacchi et al., 2015). Existem evidências de que o NO desempenha papéis importantes na promoção da germinação ou redução de dormência de sementes (Beligni; Lamattina, 2001; Kopyra; Gwózdź, 2003; Bethke et al., 2006; Libourel et al., 2006; Borisjuk et al., 2007; Arc et al., 2013); regulação da maturação de frutos e senescência de plantas (Leshem; Haramaty, 1996; Guo; Crawford, 2005; Mishina et al., 2007; Manjunatha et al., 2010; Procházková; Wilhelmová, 2011); mediação do movimento estomático como um intermediário da sinalização do ácido abscísico (ABA) (Desikan et al., 2002; Garcia-Mata; Lamattina, 2002; Neill et al., 2002; Guo et al., 2003; Bright et al., 2006; Chen et

al., 2013); formação de raízes laterais (Correa-Aragunde et al., 2008); o crescimento de raízes primárias (Fernández-Marcos et al., 2012); a formação de raízes adventícias (Pagnussat et al., 2004); o desenvolvimento de pêlos radiciais (Lombardo et al., 2006); além de afetar o nível de clorofila (Liu; Guo, 2013); o crescimento vegetativo (Beligni; Lamattina 2001; Lozano-Juste; León, 2011); a formação de nódulos (Hichri et al., 2015); e a homeostase do Fe (Buet et al., 2014). Também foi demonstrada a importância do NO como um componente do mecanismo de coordenação e regulação da sinalização de Ca^{2+} e ERO na imunidade da planta (Trapet et al., 2015).

Evidências indicam que a produção e a sinalização do NO estão envolvidas nos processos de aclimação durante estresses (Arasimowicz-Jelonek; Floryszak-Wieczorek, 2014; Sanz et al., 2015). Ademais, estudos demonstram que o tratamento de plantas com NO confere uma maior tolerância a uma variedade de estresses abióticos e bióticos, como por exemplo: seca, salinidade, radiação UV-B, metais pesados, temperaturas extremas, além de algumas doenças (Simontacchi et al., 2015; Farnese et al., 2016; Seabra; Oliveira, 2016; Singh et al., 2016; Begara-Morales et al., 2018; Liu et al., 2018; Umbreen et al., 2018; Kushwaha et al., 2019). Além disso, o NO está envolvido na via de sinalização que regula as isoformas específicas de enzimas antioxidantes que protegem contra o estresse oxidativo induzido pelo estresse luminoso (Santa-Cruz et al., 2014).

Estresses bióticos e abióticos alteram a produção de NO, enquanto doadores de NO aplicados externamente aumentam a tolerância a estresses específicos (Garcia-Mata; Lamattina, 2002; Uchida et al., 2002). Entretanto, o tratamento direto das plantas com NO é um método laborioso, já que este apresenta natureza gasosa e curta meia vida *in vivo*, além de ser rapidamente inativado pela reação com o O_2 (Nichols et al., 2012). Isso faz com que seja necessário o suprimento constante de NO aos tecidos (Seabra et al., 2015).

Existe uma grande variedade de moléculas doadoras que contam com estruturas diversas, e, conseqüentemente, diferentes mecanismos para geração NO. As moléculas mais usadas são: Trinitrato de gliceril (GTN), Nitroprussiato de sódio (SNP), S-nitrosoglutathiona (GSNO), S-Nitroso-N-acetil-D-penicilamina (SNAP), ácido S-nitroso-mercaptopuccínico (S-nitroso-MSA) (Figura 2) e outros S-nitrosotióis (RSNO). Os doadores de NO vêm sendo largamente utilizados para a análise das funções biológicas do NO em plantas (Wang et al., 2005; Floryszak-Wieczorek et al., 2006; Seabra; Durán, 2010; Misra et al., 2014; Farnese et al., 2016; Marvasi, 2017).

Há um crescente interesse no desenvolvimento de doadores de NO de baixo peso molecular, como os RSNO, que são capazes de prolongar e preservar as atividades biológicas do NO *in vivo*, sendo considerados bons reservatórios, transportadores e liberadores deste radical livre (Seabra et al., 2017).

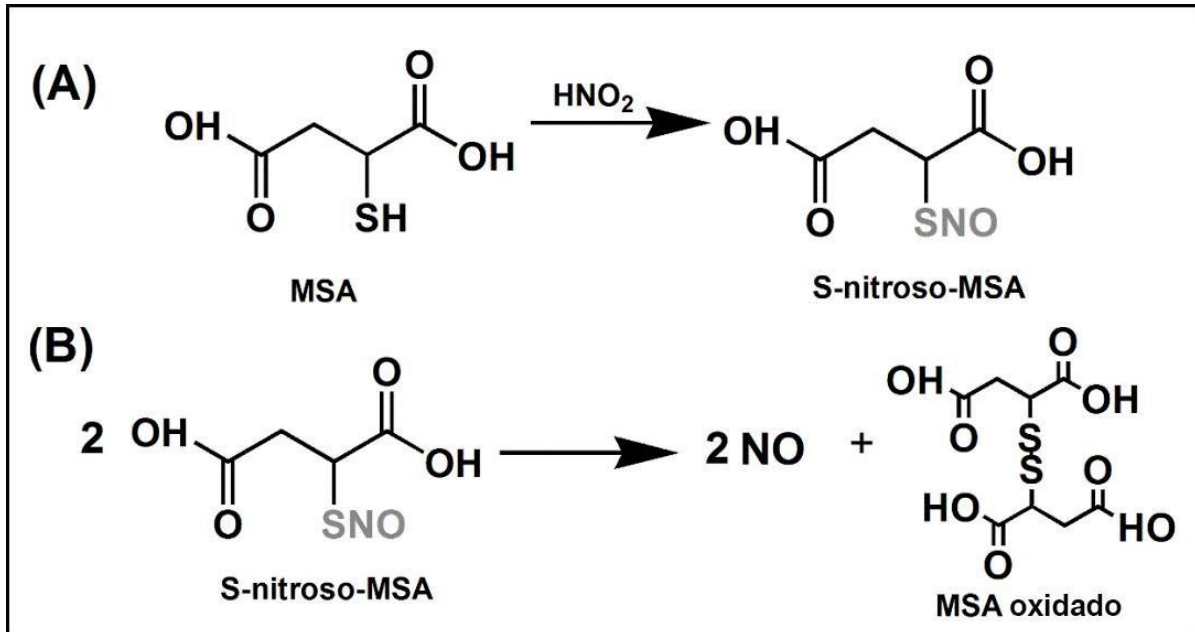


Figura 2 - (A) Nitrosação do MSA, que reage com o ácido nitroso (HNO₂), formando o S-nitroso-MSA; **(B)** A decomposição do S-nitroso-MSA libera espontaneamente óxido nítrico (NO) e produz MSA oxidado. **Adaptado de:** Seabra et al., 2017.

Entretanto, os doadores de NO têm caráter instável e são suscetíveis à fatores ambientais, como pH, luminosidade e temperatura, o que causa uma liberação rápida, podendo causar efeitos deletérios (Maragos et al., 1991; Pedroso et al., 2000; Seabra et al., 2015); e comprometer os efeitos sinalizadores do NO (Seabra et al., 2015).

Nesse contexto, a encapsulação de doadores de NO em nanomateriais surge como uma estratégia que visa proteger essas moléculas da decomposição, melhorando suas propriedades físico-químicas, aumentando a estabilidade e a atividade, permitindo uma liberação controlada e ampliando seu período de ação. Nesse caso, as nanopartículas (NPs) são estudadas como uma alternativa para minimizar essas limitações, reduzindo a ação de fatores ambientais (Seabra; Durán, 2010; Khot et al., 2012; Campos et al., 2014; Kah; Hofmann, 2014; Rossi et al., 2014; Seabra et al., 2015; Grillo et al., 2016). Essa estratégia proporciona uma redução de problemas como perdas por degradação, lixiviação e volatilização, aumentando assim a biodisponibilidade e a eficiência dos doadores de NO, diminuindo a quantidade de

substâncias químicas ativas incorporadas nas plantas e nos solos e reduzindo o impacto negativo no meio ambiente (Grillo et al., 2014; Campos et al., 2015; Maruyama et al., 2016; Pérez-de-Luque, 2017).

As NPs são materiais que dispõem de propriedades físico-químicas muito próprias devido ao seu tamanho reduzido (Wang et al., 2016). Estas apresentam uma área superficial aumentada e geralmente expressam propriedades mecânicas, ópticas, magnéticas ou químicas distintas de partículas e superfícies macroscópicas de mesma composição (Quina, 2004). Uma grande variedade de nanomateriais na forma de NPs podem ser empregados como sistemas carreadores de compostos bioativos, tais como fertilizantes e pesticidas, representando um uso potencial para aplicações em sistemas agrícolas (Ghormade et al., 2011; Seabra et al., 2014; Pascoli et al., 2018).

Vários nanomateriais podem ser associados ao NO para entregar diretamente esse radical livre aos sítios-alvo em plantas (Seabra et al., 2014). Em particular, as NPs de quitosana são biodegradáveis e não apresentam influência negativa sobre o metabolismo das plantas (Seabra et al., 2014). Além disso, a quitosana possui propriedades mucoadesivas, o que facilita o transporte desses compostos ativos através das membranas celulares (Seabra et al., 2014). As moléculas doadoras de NO têm fortes interações eletrostáticas com o esqueleto de quitosana, levando a uma alta eficiência de encapsulação dessa molécula (Pelegriño et al., 2018), permitindo a aplicação versátil de nanopartículas de quitosana contendo NO na medicina e na agricultura.

Os doadores de NO já foram encapsulados com sucesso em NPs de quitosana/tripolifosfato para atividades anticâncer (Pelegriño et al., 2017a), antibacteriana (Cardozo et al., 2014) e antiparasitária (Seabra et al., 2015) e para aumentar a liberação de NO na pele humana (Pelegriño et al., 2017b). Todavia, apenas em 2016 esses nanomateriais foram utilizados para proteger as plantas do estresse abiótico. Oliveira et al. (2016) analisaram o efeito de NPs de quitosana carreando S-nitroso-MSA sobre plantas de milho submetidas ao estresse salino. Os autores observaram que as nanopartículas mostraram-se mais eficientes do que o doador livre, promovendo uma liberação mais lenta e controlada do NO, resultando em proteção contra os efeitos da alta salinidade, entre eles a melhora na atividade do fotossistema II, no aumento no teor de clorofila e na taxa de crescimento das plantas. A bioatividade melhorada do NO foi associada à liberação sustentada dessa molécula

pelas NPs poliméricas (Oliveira et al., 2016). Este trabalho pioneiro abriu um leque de possibilidades para o uso dessas nanoformulações.

Portanto, as nanopartículas carreadoras de doadores de NO surgem como uma estratégia que poderia ser usada para obter mudas de espécies arbóreas de maior qualidade e mais tolerantes a estresses, aumentando o sucesso de programas de reflorestamento.

OBJETIVOS

Com base no exposto, os objetivos deste estudo foram: **(1)** analisar respostas morfofisiológicas e bioquímicas de mudas de *Heliocarpus popayanensis* Kunth e *Cariniana estrellensis* (Raddi) Kuntze submetidas ao processo de rustificação sob sol pleno, bem como o possível envolvimento do NO na resposta destas plantas; e **(2)** verificar o efeito da utilização de doador de NO, na forma livre e encapsulado em NPs poliméricas, na aclimação destas mudas submetidas ao estresse luminoso. Cada objetivo foi contemplado por um artigo científico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, W.W., Zarter, C.R., Ebbert, V., Demmig-Adams, B., 2004. Photoprotective strategies of overwintering evergreens. *AIBS Bulletin* 54(1), 41-49. [https://doi.org/10.1641/0006-3568\(2004\)054\[0041:PSOOE\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1641/0006-3568(2004)054[0041:PSOOE]2.0.CO;2)
- Allen, C.D., Macalady, A.K., Chenchouni, H., Bachelet, D., McDowell, N., Vennetier, M., Kitzberger, T., Rigling, A., Breshears, D.D., Hogg, E.H., Gonzalez, P., Fensham, R., Zhang, Z., Castro, J., Demidova, N., Lim, J.H., Allard, G., Running, S.W., Semerci, A., Cobb, N., 2010. A global overview of drought and heat-induced tree mortality reveals emerging climate change risks for forests. *For. Ecol. Manag.* 259(4), 660-684. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2009.09.001>
- Alves, P.L.C.A., Magalhães, A.C., Barja, P.R., 2002. The phenomenon of photoinhibition of photosynthesis and its importance in reforestation. *Bot. Rev.* 68(2), 193-208. [https://doi.org/10.1663/0006-8101\(2002\)068\[0193:TPOPOP\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1663/0006-8101(2002)068[0193:TPOPOP]2.0.CO;2)
- Arasimowicz-Jelonek, M., Floryszak-Wieczorek, J., 2014. Nitric oxide: an effective weapon of the plant or the pathogen? *Mol. Plant Pathol.* 15(4), 406-416. <https://doi.org/10.1111/mpp.12095>
- Arc, E., Sechet, J., Corbineau, F., Rajjou, L., Marion-Poll, A., 2013. ABA crosstalk with ethylene and nitric oxide in seed dormancy and germination. *Front. Plant Sci.* 4, 63. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00063>
- Asada K., 1999. The water-water cycle in chloroplasts, scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50, 601-639. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.50.1.601>
- Asada, K., 2006. Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiol.* 141(2), 391-396. <https://doi.org/10.1104/pp.106.082040>
- Asgher, M., Per, T.S., Masood, A., Fatma, M., Freschi, L., Corpas, F.J., Khan, N.A., 2017. Nitric oxide signaling and its crosstalk with other plant growth regulators in plant responses to abiotic stress. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 24(3), 2273-2285. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7947-8>
- Baker, N.R. 1996 Photoinhibition of photosynthesis. In: Jennings R.C., Zucchelli G., Ghatti F., Colombetti G. (eds.). *Light as an energy source and information carrier in plant physiology*. NATO ASI Series (Series A: Life Sciences). Springer, Boston, MA. 287, 89-97. https://doi.org/10.1007/978-1-4613-0409-8_7
- Begara-Morales, J.C., Chaki, M., Valderrama, R., Sánchez-Calvo, B., Mata-Pérez, C., Padilla, M.N., Corpas, F.J., Barroso, J.B., 2018. Nitric oxide buffering and conditional nitric oxide release in stress response. *J. Exp. Bot.* 69(14), 3425-3438. <https://doi.org/10.1093/jxb/ery072>

- Beligni, M.V., Lamattina, L., 2001. Nitric oxide: a non-traditional regulator of plant growth. *Trends Plant Sci.* 6(11), 508-509. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(01\)02156-2](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(01)02156-2)
- Benayas, J.M.R., Newton, A.C., Diaz, A., Bullock, J.M., 2009. Enhancement of biodiversity and ecosystem services by ecological restoration: a meta-analysis. *Science* 325(5944), 1121-1124. <https://doi.org/10.1126/science.1172460>
- Bethke, P.C., Libourel, I.G., Reinöhl, V., Jones, R.L., 2006. Sodium nitroprusside, cyanide, nitrite, and nitrate break *Arabidopsis* seed dormancy in a nitric oxide-dependent manner. *Planta* 223(4), 805-812. <https://doi.org/10.1007/s00425-005-0116-9>
- Borisjuk, L., Macherel, D., Benamar, A., Wobus, U., Rolletschek, H., 2007. Low oxygen sensing and balancing in plant seeds: a role for nitric oxide. *New Phytol.* 176(4), 813-823. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02226.x>
- Botelho, S.A., Davide, A.C., 2002. Métodos silviculturais para recuperação de nascentes e recomposição de matas ciliares. *Simpósio Nacional sobre Recuperação de Áreas Degradadas 5*, 123-145.
- Bright, J., Desikan, R., Hancock, J.T., Weir, I.S., Neill, S.J., 2006. ABA-induced NO generation and stomatal closure in *Arabidopsis* are dependent on H₂O₂ synthesis. *Plant J.* 45(1), 113-122. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02615.x>
- Buet, A., Moriconi, J.I., Santa-María, G.E., Simontacchi, M., 2014. An exogenous source of nitric oxide modulates zinc nutritional status in wheat plants. *Plant Physiol. Biochem.* 83, 337-345. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2014.08.020>
- Calzavara, A.K., Bianchini, E., Mazzanatti, T., Oliveira, H.C., Stolf-Moreira, R., Pimenta, J.A., 2015. Morphoanatomy and ecophysiology of tree seedlings in semideciduous forest during high-light acclimation in nursery. *Photosynthetica* 53, 597-608. <https://doi.org/10.1007/s11099-015-0151-0>
- Campos, E.V.R., Oliveira, J.L., Fraceto, L.F., 2014. Applications of controlled release systems for fungicides, herbicides, acaricides, nutrients, and plant growth hormones: a review. *Adv. Sci. Eng. Med.* 6, 373–387. <https://doi.org/10.1166/ asem.2014.1538>
- Campos, E.V.R., Oliveira, J.L., Silva, C.M.G., Pascoli, M., Pasquoto, T., Lima, R., Abhilash, P.C., Fraceto, L.F., 2015. Polymeric and solid lipid nanoparticles for sustained release of carbendazim and tebuconazole in agricultural applications. *Sci. Rep.* 5, e13809. <https://doi.org/10.1038/srep13809>
- Cano, F.J., Sanchez-Gomez, D., Gasco, A., Rodriguez-Calcerrada, J., Gil, L., Warren, C.R., Aranda, I., 2011. Light acclimation at the end of the growing season in two broadleaved oak species. *Photosynthetica* 49(4), 581-592. <https://doi.org/10.1007/s11099-011-0066-3>

- Cardozo, V.F., Lancheros, C.A.C., Narciso, A.M., Valereto E.C.S., Kobayashi R.K.T., Seabra A.B., Nakazato G., 2014. Evaluation of antibacterial activity of nitric oxide-releasing polymeric particles against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* from bovine mastitis. *Int. J. Pharm.* 473, 20–29. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.06.051>
- Chen, J., Xiong, D.Y., Wang, W.H., Hu, W.J., Simon, M., Xiao, Q., Liu, T.W., Liu, X., Zheng, H.L., 2013. Nitric oxide mediates root K⁺/Na⁺ balance in a mangrove plant, *Kandelia obovata*, by enhancing the expression of AKT1-type K⁺ channel and Na⁺/H⁺ antiporter under high salinity. *Plos one* 8(8), e71543. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071543>
- Claussen, J.W., 1996. Acclimation abilities of three tropical rainforest seedlings to an increase in light intensity. *For. Ecol. Manag.* 80(1-3), 245-255. [https://doi.org/10.1016/0378-1127\(95\)03606-7](https://doi.org/10.1016/0378-1127(95)03606-7)
- Cleary, B.D., Greaves, R.D., Owston, P.W., 1978. Seedlings. In: Cleary, B.D., Greaves, R.D., Hermann, R.K. (eds.). *Regenerating Oregon's forests*. Oregon State University Extension Service, Corvallis. pp. 63-98.
- Cornwell, W.K., Ackerly, D.D., 2009. Community assembly and shifts in plant trait distributions across an environmental gradient in coastal California. *Ecol. Monogr.* 79(1), 109-126. <https://doi.org/10.1890/07-1134.1>
- Correa-Aragunde, N., Lombardo, C., Lamattina, L., 2008. Nitric oxide: an active nitrogen molecule that modulates cellulose synthesis in tomato roots. *New Phytol.* 179(2), 386-396. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02466.x>
- Cortina, J., Vilagrosa, A., Trubat, R., 2013. The role of nutrients for improving seedling quality in drylands. *New Forests* 44(5), 719-732. <https://doi.org/10.1007/s11056-013-9379-3>
- Craven, D., Dent, D., Braden, D., Ashton, M.S., Berlyn, G. P., Hall, J.S., 2011. Seasonal variability of photosynthetic characteristics influences growth of eight tropical tree species at two sites with contrasting precipitation in Panama. *For. Ecol. Manag.* 261(10), 1643-1653. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2010.09.017>
- Cunha, A.O., Andrade, L.A., Bruno, R.L.A., Silva, J.A.L., Souza, V.C., 2005. Efeitos de substratos e das dimensões dos recipientes na qualidade das mudas de *Tabebuia impetiginosa* (Mart. Ex D.C.) Standl. *Rev. Árvore* 29. 507-516. <https://doi.org/10.1590/s0100-67622005000400002>
- D'avila, F.S., Paiva, H.N.D., Leite, H.G., Barros, N.F.D., Leite, F.P., 2011. Efeito do potássio na fase de rustificação de mudas clonais de eucalipto. *Rev. Árvore* 35(1), 13-19. <http://doi.org/10.1590/S0100-67622011000100002>.
- Davis, A.S., Jacobs, D.F., 2005. Quantifying root system quality of nursery seedlings and relationship to outplanting performance. *New Forests* 30(2), 295-311. <https://doi.org/10.1007/s11056-005-7480-y>

Demmig-Adams, B., Adams III, W.W. 1992. Photoprotection and other responses of plants to high light stress. *Annu. Rev. Plant Biol.* 43(1), 599-626. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.43.060192.003123>

Desikan, R., Griffiths, R., Hancock, J., Neill, S., 2002. A new role for an old enzyme: nitrate reductase-mediated nitric oxide generation is required for abscisic acid-induced stomatal closure in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl Acad. Sci.* 99(25), 16314-16318. <https://doi.org/10.1073/pnas.252461999>

Dickson, A., Leaf, A.L., Hosner, J.F., 1960. Quality appraisal of white spruce and white pine seedling stock in nurseries. *Forest. Chron.* 36(1), 10-13. <https://doi.org/10.5558/tfc36010-1>

Estringu, A., Aksakal, O., Tabay, D., Kara, A.A., 2016. Effects of sodium nitroprusside (SNP) pretreatment on UV-B stress tolerance in lettuce (*Lactuca sativa* L.) seedlings. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23(1), 589-597. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5301-1>

Fahrig, L., 2003. Effects of habitat fragmentation on biodiversity. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 34(1), 487-515. <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.34.011802.132419>

Farnese, F.S., Menezes-Silva P.E., Gusman G.S., Oliveira J.A., 2016. When bad guys become good ones: the key role of reactive oxygen species and nitric oxide in the plant responses to abiotic stress. *Front. Plant Sci.* 7, 1-15. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00471>

Favaretto, V.F., Martinez, C.A., Soriani, H.H., Furriel, R.P., 2011. Differential responses of antioxidant enzymes in pioneer and late-successional tropical tree species grown under sun and shade conditions. *Environ. Exp. Bot.* 70(1), 20-28. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2010.06.003>

Fernández-Marcos, M., Sanz, L., Lorenzo, O., 2012. Nitric oxide: an emerging regulator of cell elongation during primary root growth. *Plant Signal. Behav.* 7(2), 196-200. <https://doi.org/10.4161/psb.18895>

Floryszak-Wieczorek, J., Milczarek, G., Arasimowicz, M., Ciszewski, A., 2006. Do nitric oxide donors mimic endogenous NO-related response in plants? *Planta* 224(6), 1363-1372. <https://doi.org/10.1007/s00425-006-0321-1>

Fonseca, É.D.P., Valéri, S.V., Miglioranza, É., Fonseca, N.A.N., Couto, L., 2002. Padrão de qualidade de mudas de *Trema micrantha* (L.) Blume, produzidas sob diferentes períodos de sombreamento. *Rev. Árvore* 26(4), 515-523. <https://doi.org/10.1590/s0100-67622002000400015>

Freschi, L., 2013. Nitric oxide and phytohormone interactions: current status and perspectives. *Front. Plant Sci.* 4, 398. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00398>

Fundação SOS Mata Atlântica., 2015. Relatório Anual de Atividades - Edição 2015. Fundação SOS Mata Atlântica, São Paulo.

- Galindo-Leal, C.G., Câmara, I.G., 2003. The Atlantic Forest of South America: biodiversity status, threats, and outlook. Island Press, Washington, D.C.
- Gandolfi, S., Rodrigues, R.R., 2007. Manejo ambiental e restauração de áreas degradadas. In: Cargill: Metodologias de restauração florestal. Fundação Cargill, Campinas, pp. 109-143.
- Garcia-Mata, C., Lamattina, L., 2002. Nitric oxide and abscisic acid cross talk in guard cells. *Plant Physiol.* 128(3), 790-792. <https://doi.org/10.1104/pp.011020>
- Ghormade, V., Deshpande, M.V., Paknikar, K.M., 2011. Perspectives for nano-biotechnology enabled protection and nutrition of plants. *Biotechnol. Adv.* 29(6), 792-803. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.06.007>
- Givnish, T.J., 1988. Adaptation to sun and shade a whole-plant perspectives, ecology of photosynthesis in sun and shade. *Aust. J. Plant Physiol.* 15, 63-92. <https://doi.org/10.1071/PP9880063>
- Glufke, C., Mainardi, G.L., Schneider, P.R., Alvarez Filho, A., 1999. Produção de uma floresta natural em Santa Maria, RS. *Ciênc. Florest.* 4, 61–76. <https://doi.org/10.5902/19805098298>
- Gomes, J.M., Couto, L., Leite Garcia, H., Xavier, A., Garcia, S.L.R., 2002. Parâmetros morfológicos na avaliação da qualidade de mudas de *Eucalyptus grandis*. *Rev. Árvore* 26(6), 655-664. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-67622002000600002>
- Grillo, R., Abhilash, P.C., Fraceto, L.F., 2016. Nanotechnology applied to bio-encapsulation of pesticides. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 16,1231–1234. <https://doi.org/10.1166/jnn.2016.12332>
- Grillo, R., Pereira, A.E.S., Nishisaka, C.S., Lima, R., Oehlke, K., Greiner, R., Fraceto, L.F., 2014. Chitosan/tripolyphosphate nanoparticles loaded with paraquat herbicide: an environmentally safer alternative for weed control. *J. Hazard. Mater.* 278,163–171. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.05.079>
- Griscom, H.P., Ashton, P.M.S., Berlyn, G.P., 2005. Seedling survival and growth of native tree species in pastures: implications for dry tropical forest rehabilitation in central Panama. *For. Ecol. Manag.* 218(1-3), 306-318. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2005.08.026>
- Guariguata, M.R., Ostertag, R., 2001. Neotropical secondary forest succession: changes in structural and functional characteristics. *For. Ecol. Manag.* 148(1-3), 185-206. [https://doi.org/10.1016/S0378-1127\(00\)00535-1](https://doi.org/10.1016/S0378-1127(00)00535-1)
- Guo, F.Q., Crawford, N.M., 2005. *Arabidopsis* nitric oxide synthase1 is targeted to mitochondria and protects against oxidative damage and dark-induced senescence. *Plant Cell* 17(12), 3436-3450. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.037770>

- Guo, F.Q., Okamoto, M., Crawford, N.M., 2003. Identification of a plant nitric oxide synthase gene involved in hormonal signaling. *Science* 302(5642), 100-103. <https://doi.org/10.1126/science.1086770>
- Guo, X.R., Cao, K.F., Xu, Z.F., 2006. Acclimation to irradiance in seedlings of three tropical rain forest *Garcinia* species after simulated gap formation. *Photosynthetica* 44(2), 193-201. <https://doi.org/10.1007/s11099-006-0006-9>
- Henry, H.A., Aarssen, L.W., 2001. Inter-and intraspecific relationships between shade tolerance and shade avoidance in temperate trees. *Oikos* 93(3), 477-487. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0706.2001.930313.x>
- Hichri, I., Boscari, A., Castella, C., Rovere, M., Puppo, A., Brouquisse, R., 2015. Nitric oxide: a multifaceted regulator of the nitrogen-fixing symbiosis. *J. Exp. Bot.* 66(10), 2877-2887. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv051>
- Houter, N.C., Pons, T.L., 2005. Gap size effects on photoinhibition in understorey saplings in tropical rainforest. *Plant Ecol.* 179(1), 43-51. <https://doi.org/10.1007/s11258-004-5775-2>
- Ishida, A., Nakano, T., Matsumoto, Y., Sakoda, M., Ang, L.H., 1999. Diurnal changes in leaf gas exchange and chlorophyll fluorescence in tropical tree species with contrasting light requirements. *Ecol. Res.* 14(2), 77-88. <https://doi.org/10.1046/j.1440-1703.1999.00291.x>
- Jacobs, D.F., Ross-Davis, A.L., Davis, A.S., 2004. Establishment success of conservation tree plantations in relation to silvicultural practices in Indiana, USA. *New Forests* 28(1), 23-36. <https://doi.org/10.1023/B:NEFO.0000031329.70631.d0>
- Jacobs, D.F., Salifu, K.F., Seifert, J. R., 2005. Relative contribution of initial root and shoot morphology in predicting field performance of hardwood seedlings. *New Forests* 30(2-3), 235-251. <https://doi.org/10.1007/s11056-005-5419-y>
- Jiang, C.D., Wang, X., Gao, H.Y., Shi, L., Chow, F.W., 2011. Systemic regulation of leaf anatomical structure, photosynthetic performance and high-light tolerance in sorghum. *Plant Physiol.* 155(3), 1416-24. <https://doi.org/10.1104/pp.111.172213>
- Johnson, J.D., Cline, M.L., 1991. Seedling quality of southern pines. In: Duryea, M.L., Dougherty, P.M. *Forest regeneration manual*. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers. pp. 143-159. https://doi.org/10.1007/978-94-011-3800-0_8
- Johnson, P.S., Shifley, S.R., Rogers, R., 2009. *The ecology and silviculture of oaks*. CABI.
- Kah, M., Hofmann, T., 2014. Nanopesticide research: current trends and future priorities. *Environ. Int.* 63, 224–235. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2013.11.015>
- Keller, L., Leles, P.S.S., Oliveira-Neto, S.N., 2009. Sistema de blocos prensados para produção de mudas de três espécies arbóreas nativas. *Rev. Árvore* 33, 305-314. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=48813388012>

Khot, L.R., Sankaran, S., Maja, J.M., Ehsani, R., Schuster, E.W., 2012. Applications of nanomaterials in agricultural production and crop protection: a review. *Crop Prot.* 35, 64–70. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2012.01.007>

Kitajima, K., 1994. Relative importance of photosynthetic traits and allocation patterns as correlates of seedling shade tolerance of 13 tropical trees. *Oecologia* 98(3-4), 419-428. <https://doi.org/10.1007/BF00324232>

Kitao, M., Yoneda, R., Tobita, H., Matsumoto, Y., Maruyama, Y., Arifin, A., Azani, A.M., Muhamad, M.N., 2006. Susceptibility to photoinhibition in seedlings of six tropical fruit tree species native to Malaysia following transplantation to a degraded land. *Trees* 20(5), 601-610. <https://doi.org/10.1007/s00468-006-0075-1>

Kopyra, M., Gwóźdź, E.A., 2003. Nitric oxide stimulates seed germination and counteracts the inhibitory effect of heavy metals and salinity on root growth of *Lupinus luteus*. *Plant Physiol. Biochem.* 41(11-12), 1011-1017. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2003.09.003>

Krause, G.H., Virgo, A., Winter, K., 1995. High susceptibility to photoinhibition of young leaves of tropical forest trees. *Planta* 197(4), 583-591. <https://doi.org/10.1007/BF00191564>

Krause, G.H., Koroleva, O.Y., Dalling, J.W., Winter, K., 2001. Acclimation of tropical tree seedlings to excessive light in simulated tree-fall gaps. *Plant Cell Environ.* 24(12), 1345-1352. <https://doi.org/10.1007/BF00191564>

Kushwaha, B.K., Singh, S., Tripathi, D.K., Sharma, S., Prasad, S.M., Chauhan, D.K., Kumar, V., Singh, V.P., 2019. New adventitious root formation and primary root biomass accumulation are regulated by nitric oxide and reactive oxygen species in rice seedlings under arsenate stress. *J. Hazard. Mat.* 361, 134-140. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.08.035>

Lamb, D. 2001. Reforestation. *Encyclopedia of Biodiversity*. Elsevier, 97-108. <https://doi.org/10.1016/B0-12-226865-2/00230-3>

Lambers H., Chapin F.S., Pons T.L., 2008. Photosynthesis. In: *Plant Physiological Ecology*. Springer, New York. https://doi.org/10.1007/978-0-387-78341-3_2

Larcher, W., 2003. *Physiological plant ecology: ecophysiology and stress physiology of functional groups*. Springer, New York. p. 295.

Lee, D.W., Oberbauer, S.F., Krishnapilay, B., Mansor, M., Mohamad, H., Yap, S.K., 1997. Effects of irradiance and spectral quality on seedling development of two Southeast Asian *Hopea* species. *Oecologia* 110(1), 1-9. <https://doi.org/10.1007/s004420050126>

Leles, P.S.S., Lisboa, A.C., Oliveira Neto, S.N., Grugiki, M.A., Ferreira, M.A., 2006. Qualidade de mudas de quatro espécies florestais produzidas em diferentes tubetes. *Floresta Ambient.* 13(1), 69-78.

- Leshem, Y.Y., Haramaty, E., 1996. The characterization and contrasting effects of the nitric oxide free radical in vegetative stress and senescence of *Pisum sativum* Linn. foliage. *J. Plant Physiol.* 148, 258–263. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(96\)80251-3](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(96)80251-3)
- Libourel, I.G., Bethke, P.C., De Michele, R., Jones, R.L., 2006. Nitric oxide gas stimulates germination of dormant *Arabidopsis* seeds: use of a flow-through apparatus for delivery of nitric oxide. *Planta* 223(4), 813-820. <https://doi.org/10.1007/s00425-005-0117-8>
- Liu, F., Guo, F.Q., 2013. Nitric oxide deficiency accelerates chlorophyll breakdown and stability loss of thylakoid membranes during dark-induced leaf senescence in *Arabidopsis*. *PLoS One* 8(2), e56345. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056345>
- Liu, S., Yang, R., Tripathi, D.K., Li, X., He, W., Wu, M., Ali, S., Ma, M., Cheng, Q., Pan, Y., 2018. The interplay between reactive oxygen and nitrogen species contributes in the regulatory mechanism of the nitro-oxidative stress induced by cadmium in *Arabidopsis*. *J. Hazard. Mat.* 344, 1007-1024. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.12.004>
- Lombardo, M.C., Graziano, M., Polacco, J.C., Lamattina, L., 2006. Nitric oxide functions as a positive regulator of root hair development. *Plant Signal. Behav.* 1(1), 28-33. <https://doi.org/10.4161/psb.1.1.2398>
- Lovelock, C.E., Osmond, C.B., Jebb, M., 1994. Photoinhibition and recovery in tropical plant species: response to disturbance. *Oecologia* 97(3), 297-307. <https://doi.org/10.1007/BF00317318>
- Lozano-Juste, J., León, J., 2011. Nitric oxide regulates DELLA content and PIF expression to promote photomorphogenesis in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 156, 1410-1423. <https://doi.org/10.1104/pp.111.177741>
- Lusk, C.H., Reich, P.B., Montgomery, R.A., Ackerly, D.D., Cavender-Bares, J., 2008. Why are evergreen leaves so contrary about shade? *Trends Ecol. Evol.* 23(6), 299-303. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2008.02.006>
- Malnoë, A., 2018. Photoinhibition or photoprotection of photosynthesis? Update on the (newly termed) sustained quenching component qH. *Environ. Exp. Bot.* 154, 123–133. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2018.05.005>
- Manjunatha, G., Lokesh, V., Neelwarne, B., 2010. Nitric oxide in fruit ripening: trends and opportunities. *Biotechnol. Adv.* 28(4), 489-499. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.03.001>
- Maragos, C.M., Morley, D., Wink, D.A., Dunams, T.M., Saavedra, J.E., Hoffman, A., Bove, A.A., Isaac, L., Hrabie, J.A., Keefer, L.K., 1991. Complexes of NO with nucleophiles as agents for the controlled biological release of nitric oxide. Vasorelaxant effects. *J. Med. Chem.* 34(11), 3242-3247. <https://doi.org/10.1021/jm00115a013>

- Martins, S.C.V., Detmann, K.C., Reis, J.V.D., Pereira, L.F., Sanglard, L.M.V.P., Rogalski, M., DaMatta, F.M., 2013. Photosynthetic induction and activity of enzymes related to carbon metabolism: insights into the varying net photosynthesis rates of coffee sun and shade leaves. *Theor. Exp. Plant Physiol.* 25(1), 62-69. <http://doi.org/10.1590/S2197-00252013000100008>
- Maruyama, Y., Nakamura, S., Marengo, R.A., Vieira, G., Sato, A., 2005. Photosynthetic traits of seedlings of several tree species in an Amazonian forest. *Tropics* 14(3), 211-219. <https://doi.org/10.3759/tropics.14.211>
- Maruyama, C.R., Guilger, M., Pascoli, M., Bileshy-José, N., Abhilash, P.C., Fraceto, L.F., De Lima, R., 2016. Nanoparticles based on chitosan as carriers for the combined herbicides imazapic and imazapyr. *Sci. Rep.* 6, 19768. <https://doi.org/10.1038/srep19768>
- Marvasi, M., 2017. Potential use and perspectives of nitric oxide donors in agriculture. *J. Sci. Food Agric.* 97(4), 1065-1072. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8117>
- Matos, F.S., Wolfgramm, R., Gonçalves, F.V., Cavatte, P C., Ventrella, M.C., DaMatta, F.M. 2009. Phenotypic plasticity in response to light in the coffee tree. *Environ. Exp. Bot.* 67(2), 421-427. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2009.06.018>
- Mattsson, A., 1997. Predicting field performance using seedling quality assessment. *New Forests* 13(1-3), 227-252. <https://doi.org/10.1023/A:1006590409595>
- Mazzanatti, T., Calzavara, A.K., Pimenta, J.A., Oliveira, H.C., Stolf-Moreira, R., Bianchini, E., 2016. Light acclimation in nursery, morphoanatomy and ecophysiology of seedlings of three light-demanding neotropical tree species. *Braz. J. Bot.* 39(1), 19-28. <https://doi.org/10.1007/s40415-015-0203-5>
- Mendoza-Bautista, C., Garcia-Moreno, F., Rodríguez-Trejo, D.A., Castro-Zavala, S., 2011. Solar radiation and seedling quality in a vara de perilla (*Symphoricarpos microphyllus* HBK) plantation. *Agrociencia* 45(2), 235-243. http://scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-31952011000200008&lng=es&nrm=iso. ISSN 1405-3195.
- Miller, G., Shulaev, V., Mittler, R., 2008. Reactive oxygen signaling and abiotic stress. *Physiol. Plantarum* 133(3), 481-489. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2008.01090.x>
- Mishina, T.E., Lamb, C., Zeier, J., 2007. Expression of a nitric oxide degrading enzyme induces a senescence programme in *Arabidopsis*. *Plant Cell Environ.* 30(1), 39-52. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2006.01604.x>
- Misra, A.N., Vladkova, R., Singh, R., Misra, M., Dobrikova, A.G., Apostolova, E.L., 2014. Action and target sites of nitric oxide in chloroplasts. *Nitric Oxide* 39, 35-45. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2014.04.003>
- Mittler, R., 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* 7(9), 405-410. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(02\)02312-9](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(02)02312-9)

- Moraes, G.A.B.K., Chaves, A.R.M., Martins, S.C.V., Barros, R.S., DaMatta, F.M. 2010. Why is it better to produce coffee seedlings in full sunlight than in the shade? A morphophysiological approach. *Photosynthetica* 48(2), 199-207. <https://doi.org/10.1007/s11099-010-0025-4>
- Mur, L.A., Mandon, J., Persijn, S., Cristescu, S.M., Moshkov, I.E., Novikova, G.V., Hall, M.A., Harren, F.J.M., Hebelstrup, K.H., Gupta, K.J., 2013. Nitric oxide in plants: an assessment of the current state of knowledge. *AoB plants* 5, pls052. <https://doi.org/10.1093/aobpla/pls052>
- Murchie, E.H., Horton, P., 1997. Acclimation of photosynthesis to irradiance and spectral quality in British plant species: chlorophyll content, photosynthetic capacity and habitat preference. *Plant Cell Environ.* 20(4), 438-448. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.1997.d01-95.x>
- Myers, N., Mittermeier, R.A., Mittermeier, C.G., Fonseca, G.A., Kent, J., 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403(6772), 853-858. <https://doi.org/10.1038/35002501>
- Nambiar, E.S., Sands, R., 1993. Competition for water and nutrients in forests. *Can. J. For. Res.* 23(10), 1955-1968. <https://doi.org/10.1139/x93-247>
- Neill, S.J., Desikan, R., Hancock, J.T., 2003. Nitric oxide signalling in plants. *New Phytol.* 159(1), 11-35. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2003.00804.x>
- Neill, S.J., Desikan, R., Clarke, A., Hancock, J.T., 2002. Nitric oxide is a novel component of abscisic acid signaling in stomatal guard cells. *Plant Physiol.* 128(1), 13-16. <https://doi.org/10.1104/pp.010707>
- Nichols, S.P., Storm, W.L., Koh, A., Schoenfisch, M.H., 2012. Local delivery of nitric oxide: targeted delivery of therapeutics to bone and connective tissues. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 64(12), 1177-1188. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.03.002>
- Oguchi, R., Hikosaka, K., Hirose, T., 2005. Leaf anatomy as a constraint for photosynthetic acclimation: differential responses in leaf anatomy to increasing growth irradiance among three deciduous trees. *Plant Cell Environ.* 28(7), 916-927. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2005.01344.x>
- Oliveira, H.C., Gomes B.C.R., Pelegriño M.T., Seabra A.B., 2016. Nitric oxide-releasing chitosan nanoparticles alleviate the effects of salt stress in maize plants. *Nitric Oxide* 61, 10-19. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2016.09.010>
- Osunkoya, O.O., Ash, J.E., Hopkins, M.S., Graham, A.W., 1994. Influence of seed size and seedling ecological attributes on shade-tolerance of rain-forest tree species in northern Queensland. *J. Ecol.* 82(1), 149-163. <https://doi.org/10.2307/2261394>
- Pagnussat, G.C., Lanteri, M.L., Lombardo, M.C., Lamattina, L., 2004. Nitric oxide mediates the indole acetic acid induction activation of a mitogen-activated protein kinase cascade involved in adventitious root development. *Plant Physiol.* 135(1), 279-286. <https://doi.org/10.1104/pp.103.038554>

- Pandey, S., Kushwaha, R., 2005. Leaf anatomy and photosynthetic acclimation in *Valeriana jatamansi* L. grown under high and low irradiance. *Photosynthetica* 43(1), 85-90. <https://doi.org/10.1007/s11099-005-5090-8>
- Pascoli, M., Lopes-Oliveira, P.J., Fraceto, L.F., Seabra, A.B., Oliveira, H.C., 2018. State of the art of polymeric nanoparticles as carrier systems with agricultural applications: a minireview. *Energ. Ecol. Environ.* 3(3), 137-148. <https://doi.org/10.1007/s40974-018-0090-2>
- Pedroso, M.C., Magalhaes, J.R., Durzan, D., 2000. Nitric oxide induces cell death in *Taxus* cells. *Plant Sci.* 157(2), 173-180. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(00\)00278-8](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(00)00278-8)
- Peixoto, C.P., Peixoto, M.F.S.P., 2009. Dinâmica do crescimento vegetal: princípios básicos. *Tópicos em Ciências Agrárias*, 37-53. ISBN 978-85-61346-04-1.
- Pelegriño, M.T., Araújo, D.R., Seabra, A.B., 2018. S-nitrosoglutathione-containing chitosan nanoparticles dispersed in Pluronic F-127 hydrogel: potential uses in topical applications. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 43, 211-220. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2017.10.016>
- Pelegriño, M.T., Weller, R.B., Chen, X., Bernardes, J.S., Seabra, A.B., 2017b. Chitosan nanoparticles for nitric oxide delivery in human skin. *Med. Chem. Comm.* 8(4), 713-719. <https://doi.org/10.1039/C6MD00502K>
- Pelegriño, M.T., Silva, L.C., Watashi, C.M., Haddad, P.S., Rodrigues, T., Seabra, A.B., 2017a. Nitric oxide-releasing nanoparticles: synthesis, characterization, and cytotoxicity to tumorigenic cells. *J. Nanoparticle Res.* 19(2), 57. <https://doi.org/10.1007/s11051-017-3747-4>
- Pérez-de-Luque, A., 2017. Interaction of nanomaterials with plants: what do we need for real applications in agriculture? *Front. Environ. Sci.* 5, e12. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2017.00012>
- Petritran, A.M., Lüpke, B., Petritran, I.C., 2009. Influence of light availability on growth, leaf morphology and plant architecture of beech (*Fagus sylvatica* L.), maple (*Acer pseudoplatanus* L.) and ash (*Fraxinus excelsior* L.) saplings. *Eur. J. Forest Res.* 128(1), 61-74. <https://doi.org/10.1007/s10342-008-0239-1>
- Poorter, H., Nagel, O. 2000. The role of biomass allocation in the growth response of plants to different levels of light, CO₂, nutrients and water: a quantitative review. *Aust. J. Plant Physiol.* 27(12), 1191-1191. https://doi.org/10.1071/PP99173_CO
- Portsmuth, A., Niinemets, Ü., 2007. Structural and physiological plasticity in response to light and nutrients in five temperate deciduous woody species of contrasting shade tolerance. *Funct. Ecol.* 21(1), 61-77. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2006.01208.x>
- Powles, S.B., 1984. Photoinhibition of photosynthesis induced by visible light. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 35(1), 15-44. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.35.060184.000311>

- Procházková, D., Wilhelmová, N.A., 2011. Nitric oxide, reactive nitrogen species and associated enzymes during plant senescence. *Nitric Oxide* 24(2), 61-65. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2011.01.005>
- Quina, F. H., 2004. Nanotecnologia e o meio ambiente: perspectivas e riscos. *Quím. Nova* 27(6), 1028-1029. <http://doi.org/10.1590/S0100-40422004000600031>
- Rijkers, T., Pons, T.L., Bongers, F., 2000. The effect of tree height and light availability on photosynthetic leaf traits of four neotropical species differing in shade tolerance. *Funct. Ecol.* 14(1), 77-86. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2435.2000.00395.x>
- Rossi, M., Cubadda, F., Dini, L., Terranova, M.L., Aureli, F., Sorbo, A., Passeri, D., 2014. Scientific basis of nanotechnology, implications for the food sector and future trends. *Trends Food Sci. Technol.* 40, 127–148. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.09.004>
- Rout, N.P., Shaw, B.P., 2001. Salt tolerance in aquatic macrophytes: possible involvement of the antioxidative enzymes. *Plant Sci.* 160(3), 415-423. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(00\)00406-4](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(00)00406-4)
- Rozendaal, D.M.A., Hurtado, V.H., Poorter, L., 2006. Plasticity in leaf traits of 38 tropical tree species in response to light, relationships with light demand and adult stature. *Funct. Ecol.* 20(2), 207-216. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2006.01105.x>
- Sahay, S., Gupta, M., 2017. An update on nitric oxide and its benign role in plant responses under metal stress. *Nitric Oxide* 67, 39-52. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2017.04.011>
- Salgado, I., Martínez, M.C., Oliveira, H.C., Frungillo, L., 2013. Nitric oxide signaling and homeostasis in plants: a focus on nitrate reductase and S-nitrosoglutathione reductase in stress-related responses. *Braz. J. Bot.* 36(2), 89-98. <https://doi.org/10.1007/s40415-013-0013-6>
- Salifu, K.F., Timmer, V.R., 2003. Nitrogen retranslocation response of young *Picea mariana* to nitrogen-15 supply. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 67(1), 309-317. <https://doi.org/10.2136/sssaj2003.3090>
- Santa-Cruz, D., Pacienza, N., Zilli, C., Tomaro, M., Balestrasse, K., Yannarelli, G., 2014. Nitric oxide induces specific isoforms of antioxidante enzymes in soybean leaves subjected to enhanced ultraviolet-B radiation. *J. Photochem. Photobiol. B.* 141, 202–209. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2014.09.019>
- Santner, A., Calderon-Villalobos, L.I.A., Estelle, M., 2009. Plant hormones are versatile chemical regulators of plant growth. *Nat. Chem. Biol.* 5, 301-307. <https://doi.org/10.1038/nchembio.165>
- Sanz, L., Albertos, P., Mateos, I., Sánchez-Vicente, I., Lechón, T., Fernández-Marcos, M., Lorenzo, O., 2015. Nitric oxide (NO) and phytohormones crosstalk during early plant development. *J. Exp. Bot.* 66(10), 2857-2868. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv213>

Seabra, A.B., Durán, N., 2010. Nitric oxide-releasing vehicles for biomedical applications. *J. Mater. Chem.* 20(9), 1624-1637. <https://doi.org/10.1039/B912493B>

Seabra, A.B., Oliveira, H.C., 2016. How nitric oxide donors can protect plants in a changing environment: what we know so far and perspectives. *AIMS Molecular Science* 3(4), 692-718. <https://doi.org/1010.3934/molsci.2016.4.692>

Seabra, A.B., Rai, M., Durán, N., 2014. Nano carriers for nitric oxide delivery and its potential applications in plant physiological process: a mini review. *J. Plant Biochem. Biot.* 23, 1–10. <https://doi.org/10.1007/s13562-013-0204-z>

Seabra, A.B., Justo, G.Z., Haddad, P.S., 2015. State of the art, challenges and perspectives in the design of nitric oxide-releasing polymeric nanomaterials for biomedical applications. *Biotechnol. Adv.* 33(6), 1370-1379. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.01.005>

Seabra, A.B., Fabbri, G.K., Pelegrino, M.T., Silva, L.C., Rodrigues, T., 2017. Synthesis, characterization and cytotoxicity of S-nitroso-mercaptopuccinic acid-containing alginate/chitosan nanoparticles. In: *Journal of Physics: Conference Series*. IOP Publishing 838(1), e012032. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/838/1/012032>

Singhakumara, B.M.P., Gamage, H.K., Ashton, M.S., 2003. Comparative growth of four *Syzygium* species within simulated shade environments of a Sri Lankan rain forest. *Forest Ecol. Manag.* 174(1-3), 511-520. [https://doi.org/10.1016/S0378-1127\(02\)00071-3](https://doi.org/10.1016/S0378-1127(02)00071-3)

Silva, J.M.C., Tabarelli, M., 2000. Tree species impoverishment and the future flora of the Atlantic forest of northeast Brazil. *Nature* 404, 72-74. <https://doi.org/10.1038/35003563>

Silvertown, J., 1998. Plant phenotypic plasticity and non-cognitive behaviour. *Trends Ecol. Evol.* 13(7), 255-256. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(98\)01398-6](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(98)01398-6)

Simontacchi, M., Galatro A., Ramos-Artuso F., Santa-María G.E., 2015. Plant survival in a changing environment: the role of nitric oxide in plant responses to abiotic stress. *Front. Plant Sci.* 6, 1–19. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00977>

Singh, R., Singh, S., Parihar, P., Mishra, R.K., Tripathi, D.K., Singh, V.P., Chauhan, D.K., Prasad, S.M., 2016. Reactive oxygen species (ROS): beneficial companions of plants' developmental processes. *Front. Plant Sci.* 7, e1299. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01299>

Smith, H., Whitelam, G.C., 1997. The shade avoidance syndrome: multiple responses mediated by multiple phytochromes. *Plant Cell Environ.* 20(6), 840-844. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.1997.d01-104.x>

Soares, W.L., Medri, M.E., 2002. Alguns aspectos da colonização da bacia do Tibagi. In: Medri, M.E., Bianchini, E., Shibatta, O.A., Pimenta, J.A. *A bacia do rio Tibagi*. Londrina: Londrina. pp. 69-79.

- Tabarelli, M., Gascon, C., 2005. Lições da pesquisa sobre fragmentação: aperfeiçoando políticas e diretrizes de manejo para a conservação da biodiversidade. *Megadiversidade* 1, 181–188.
- Tatagiba, S.D., Pezzopane, J.E.M., Dos Reis, E.F., Dardengo, M.C.J.D., Effgen, T.A.M., 2007. Comportamento fisiológico de dois clones de *Eucalyptus* na época seca e chuvosa. *Cerne*, 13(2), 149-159. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=74413204>
- Taugourdeau, O., Chaubert-Pereira, F., Sabatier, S., Guédon, Y., 2011. Deciphering the developmental plasticity of walnut saplings in relation to climatic factors and light environment. *J. Exp.Bot.* 62(15), 5283-5296. <https://doi.org/10.1093/jxb/err115>
- Thiele, A., Schirwitz, K., Winter, K., Krause, G.H., 1996. Increased xanthophyll cycle activity and reduced D1 protein inactivation related to photoinhibition in two plant systems acclimated to excess light. *Plant Sci.* 115(2), 237-250. [https://doi.org/10.1016/0168-9452\(96\)04363-4](https://doi.org/10.1016/0168-9452(96)04363-4)
- Tognetti, R., Michelozzi, M., Borghetti, M., 1994. Response to light of shade-grown beech seedlings subjected to different watering regimes. *Tree Physiol.* 14(7-8-9), 751-758. <https://doi.org/10.1093/treephys/14.7-8-9.751>
- Trapet, P., Kulik, A., Lamotte, O., Jeandroz, S., Bourque, S., Nicolas-Francès, V., Rosnoblet, C., Besson-Bard, A., Wendehenne, D., 2015. NO signaling in plant immunity: a tale of messengers. *Phytochem.* 112, 72-79. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2014.03.015>
- Uchida, A., Jagendorf, A.T., Hibino, T., Takabe, T., Takabe, T., 2002. Effects of hydrogen peroxide and nitric oxide on both salt and heat stress tolerance in rice. *Plant Sci.* 163, 515–523. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(02\)00159-0](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(02)00159-0)
- Umbreen, S., Lubega, J., Cui, B., Pan, Q., Jiang, J., Loake, G.J., 2018. Specificity in nitric oxide signalling. *J. Exp. Bot.* 69(14), 3439-3448. <https://doi.org/10.1093/jxb/ery184>
- Valladares, F., Pearcy, R.W., 1997. Interactions between water stress, sun-shade acclimation, heat tolerance and photoinhibition in the sclerophyll *Heteromeles arbutifolia*. *Plant Cell Environ.* 20(1), 25-36. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.1997.d01-8.x>
- Valladares, F., Saldana, A., Gianoli, E., 2012. Costs versus risks: architectural changes with changing light quantity and quality in saplings of temperate rainforest trees of different shade tolerance. *Austral Ecol.* 37(1), 35-43. <https://doi.org/10.1111/j.1442-9993.2011.02245.x>
- Valladares, F., Chico, J., Aranda, I., Balaguer, L., Dizengremel, P., Manrique, E., Dreyer, E., 2002. The greater seedling high-light tolerance of *Quercus robur* over *Fagus sylvatica* is linked to a greater physiological plasticity. *Trees* 16(6), 395-403. <https://doi.org/10.1007/s00468-002-0184-4>

- Vilela, A.E., Rennella, M.J., Ravetta, D.A., 2003. Responses of tree-type and shrub-type *Prosopis* (Mimosaceae) taxa to water and nitrogen availabilities. *Forest Ecol. Manag.* 186(1-3), 327-337. [https://doi.org/10.1016/S0378-1127\(03\)00299-8](https://doi.org/10.1016/S0378-1127(03)00299-8)
- Walter, A., Scharr, H., Gilmer, F., Zierer, R., Nagel, K.A., Ernst, M., Wiese A., Virnich O., Christ M.M., Uhlig B., Jünger S., Schurr U., 2007. Dynamics of seedling growth acclimation towards altered light conditions can be quantified via GROWSCREEN: a setup and procedure designed for rapid optical phenotyping of different plant species. *New Phytol.* 174(2), 447-455. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02002.x>
- Walters, R.G., 2005. Towards an understanding of photosynthetic acclimation. *J. Exp. Bot.* 56(411), 435-447. <https://doi.org/10.1093/jxb/eri060>
- Wang, P.G., Cai, T.B., Taniguchi, N. (eds.), 2005. Nitric oxide donors: for pharmaceutical and biological applications. John Wiley & Sons.
- Wang, P., Lombi, E., Zhao, F.J., Kopittke, P.M., 2016. Nanotechnology: a new opportunity in plant sciences. *Trends Plant Sci.* 21(8), 699-712. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.04.005>
- Warren, C.R., Löw, M., Matyssek, R., Tausz, M., 2007. Internal conductance to CO₂ transfer of adult *Fagus sylvatica*: variation between sun and shade leaves and due to free-air ozone fumigation. *Environ. Exp. Bot.* 59(2), 130-138. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2005.11.004>
- Williams, N.M., 2011. Restoration of nontarget species: bee communities and pollination function in riparian forests. *Restor. Ecol.* 19, 450-459. <https://doi.org/10.1111/j.1526-100X.2010.00707.x>
- Wilson, I.D., Neill, S.J., Hancock, J.T., 2008. Nitric oxide synthesis and signalling in plants. *Plant Cell Environ.* 31(5), 622-631. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2007.01761.x>
- Yamashita, N., Koike, N., Ishida, A., 2002. Leaf ontogenetic dependence of light acclimation in invasive and native subtropical trees of different successional status. *Plant Cell Environ.* 25(10), 1341-1356. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.2002.00907.x>
- Zamith, L.R., Scarano, F.R., 2004. Produção de mudas de espécies das restingas do município do Rio de Janeiro, RJ, Brasil. *Acta Bot. Bras.* 18(1), 161-176. <https://doi.org/10.1590/S0102-33062004000100014>
- Zanella, F., Soncela, R., Lima, A.D.S., 2006. Formação de mudas de maracujazeiro amarelo sob níveis de sombreamento em Ji-Paraná/RO. *Ciência e Agrotec.* 30(5), 880-884. <https://doi.org/10.1590/S1413-70542006000500009>

CAPÍTULO 1

Respostas bioquímicas e morfofisiológicas de mudas das espécies arbóreas neotropicais *Heliocarpus popayanensis* Kunth e *Cariniana estrellensis* (Raddi) Kuntze ao estresse luminoso

Patrícia Juliana Lopes-Oliveira ^{a,*}; Amedea Barozzi Seabra ^b; Halley Caixeta de Oliveira ^a

^a Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Departamento de Biologia Animal e Vegetal, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina (UEL). Rodovia Celso Garcia Cid, PR 445, km 380, Campus Universitário, CEP 86057-970 Londrina, PR, Brasil.

^b Centro de Ciências Naturais e Humanas, Universidade Federal do ABC (UFABC), Av. dos Estados 5001, CEP 09210-580, Santo André, SP, Brasil.

* Autor para correspondência:

E-mail: patty_jull@hotmail.com

Artigo a ser submetido ao periódico - **Experimental and Environmental Botany**

Normas do periódico: <https://www.elsevier.com/journals/environmental-and-experimental-botany/0098-8472/guide-for-authors>

RESUMO

Áreas desflorestadas apresentam condições microclimáticas muito distintas das encontradas em florestas e o plantio de mudas em programas de reflorestamento surge como uma alternativa para amenizar o processo de perdas na biodiversidade destas áreas. Contudo, o excesso de luz incidente nestas áreas provoca nas mudas danos oxidativos e fotoinibição. O processo de rustificação em viveiros, no qual as mudas são expostas à luz solar direta, favorece seu estabelecimento e desenvolvimento após o plantio. Este processo propicia o desenvolvimento de características e mecanismos de fotoproteção pelas plantas. Este estudo teve como objetivo avaliar a influência do processo de rustificação em viveiro sobre parâmetros morfológicos, fisiológicos e bioquímicos de duas espécies utilizadas em reflorestamentos de Floresta Estacional Semidecidual: *Heliocarpus popayanensis* Kunth e *Cariniana estrellensis* (Raddi) Kuntze. As mudas foram cultivadas durante 6 semanas em viveiro, sendo parte destas mantidas no setor de crescimento (sombra) e parte transferidas para o setor de rustificação (sol pleno). Utilizando-se de índices que relacionam parâmetros morfológicos foi estimada a qualidade das mudas. Além disso, foram investigados parâmetros fisiológicos e bioquímicos associados à resposta destas plantas ao aumento da intensidade luminosa. Com a rustificação, as mudas de ambas as espécies exibiram aumento de qualidade, com a redução da área foliar específica e das razões altura/diâmetro e parte aérea/raiz e aumento no índice de qualidade de Dickson. Nenhuma das espécies sofreu de fotoinibição crônica, apresentando somente a dinâmica. A espécie *H. popayanensis* desenvolveu folhas menores e mais espessas sob sol pleno. Nestas condições também apresentou aumento da fotossíntese líquida (*A*), condutância estomática e eficiência instantânea de carboxilação, além do aumento nos parâmetros bioquímicos relacionados à resposta antioxidante, como a atividade da enzima superóxido dismutase e níveis de fenóis, flavonoides e óxido nítrico. *C. estrellensis* apresentou maior diâmetro do caule e maiores níveis de carotenoides sob sol pleno. Esta não aumentou sua *A* neste tratamento, porém houve aumento da transpiração e queda na eficiência no uso da água. Não foram evidenciadas respostas nos parâmetros relacionados ao metabolismo antioxidante nesta espécie sob elevada luminosidade. O processo de rustificação à alta irradiância estimulou diferentes respostas entre as espécies estudadas, e as mudas das duas espécies foram capazes de se aclimatar às novas condições de luminosidade. Estas adquiriram características de tolerância, que provavelmente favoreceriam seu estabelecimento após o plantio no campo. Como já esperado para espécies pioneiras, as mudas de *H. popayanensis* apresentaram maior plasticidade à nova condição de luminosidade.

Palavras-chave: Fotoinibição; Fotossíntese; Luminosidade; Reflorestamento; Rustificação

INTRODUÇÃO

Revertendo ou desacelerando processos de perda de biodiversidade, a prática de restauração ecológica vem ganhando cada vez mais espaço, pois acelera os processos naturais de regeneração e recupera a integridade do ecossistema degradado (Lamb, 2001; Fahrig, 2003; Williams, 2011). Contudo, as mudas estabelecidas em áreas desflorestadas estão expostas a diferentes tipos e intensidades de fatores estressantes que afetam sua morfofisiologia (Griscom et al., 2005), pois as condições microclimáticas dessas áreas são muito distintas das encontradas em florestas maduras (Craven et al., 2011).

A luz é primordial para que as plantas cresçam e se desenvolvam; contudo, pode ser prejudicial se a quantidade de fótons absorvida for excedente ao necessário para a realização da fotossíntese. O excesso de luz incidente pode ocasionar o desenvolvimento de danos oxidativos nas folhas, associados à formação excessiva de espécies reativas de oxigênio (ERO), incluindo ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Asada, 1999; Mittler, 2002; Adams et al., 2004; Asada, 2006). A acumulação de ERO provoca a peroxidação lipídica, o que pode levar à morte celular da planta (Esringu et al., 2016). Além disso, o excesso de luz pode ter efeitos como a fotoinibição, a qual é caracterizada pela redução da eficiência do fotossistema II, podendo provocar uma queda na assimilação de CO_2 e no crescimento (Krause et al., 2012).

Visando amenizar esses problemas, é necessário que as mudas sejam produzidas em ambientes parcialmente controlados, como viveiros, onde as mudas passam por várias etapas até serem destinadas ao plantio. A primeira etapa abrange o tempo de semeadura e germinação, seguida da repicagem e transferência das mudas para o setor de crescimento, onde permanecem sob sombreamento moderado. A última etapa compreende a rustificação das mudas, quando são expostas à luz solar direta (Zamith; Scarano, 2004), com o intuito de favorecer seu estabelecimento, crescimento e desenvolvimento após o plantio (Davis; Jacobs, 2005; Mendoza-Bautista et al., 2011).

A rustificação visa possibilitar que as mudas respondam melhor às condições adversas encontradas em campo, como a elevada intensidade luminosa, resultando em uma maior qualidade das mudas e uma diminuição no número de replantios (Guo et al., 2006; Tatagiba et al., 2007; D'avila et al., 2011). Já foi observado para algumas

poucas espécies estudadas que esse processo de aclimação das plantas à maior intensidade luminosa propicia a diferenciação de folhas típicas de sol (Murchie; Horton, 1997; Calzavara et al., 2017), o que envolve o desenvolvimento de diversos mecanismos de fotoproteção pelas plantas, incluindo a produção de folhas menores e com maior esclerofilia, a diminuição do conteúdo de clorofilas, a produção de carotenoides associados à dissipação de energia, a indução de enzimas antioxidantes, o aumento dos níveis de fenóis e flavonoides e da razão raiz/parte aérea (RPAR) (Adams et al., 2004; Calzavara et al., 2015; Mazzanatti et al., 2016).

As folhas de sol apresentam maior tolerância à alta luminosidade, uma vez que apresentam altas taxas de assimilação de carbono e possuem melhor capacidade de dissipação do excesso de energia luminosa, enquanto folhas de sombra são mais susceptíveis aos danos provocados pelo excesso de luz (Demmig-Adams; Adams, 1992). O grau de resposta das plantas ao aumento da luz varia entre as espécies em função de sua tolerância à sombra (Cano et al., 2011). Espécies pioneiras ou intolerantes à sombra submetidas à elevada irradiância tendem a apresentar maior plasticidade na taxa de produção de folhas e na taxa fotossintética, quando comparadas com espécies tardias ou tolerantes à sombra (Givnish, 1988; Ishida et al. 1999; Portsmouth; Niinemets, 2007). Contudo, espécies não-pioneiras ou tolerantes à sombra podem também apresentar certa capacidade de aclimatar ao sol pleno (Yamashita et al., 2002).

A capacidade das plantas de responder a estresses abióticos é altamente flexível e equilibrada através da interação entre moléculas de sinalização (Freschi, 2013; Asgher et al., 2017). Por exemplo, o óxido nítrico (NO) está envolvido nos processos de aclimação e pode ser usado para amenizar esses estresses (Arasimowicz-Jlonek; Floryszak-Wieczorek, 2014; Sanz et al., 2015). Todavia, o envolvimento dessa molécula na resposta de mudas de espécies arbóreas neotropicais a altas intensidades luminosas ainda não foi testado.

O conhecimento acerca da capacidade de aclimação de uma espécie a diferentes condições luminosas é relevante, posto que as espécies de plantas competem entre si por espaço e recursos limitados (Krause et al., 2001). Desta forma, são necessários estudos que determinem as características morfofisiológicas das mudas, visto que estes podem auxiliar na previsão da sobrevivência e do desenvolvimento inicial das mudas em campo, conquistando dessa forma o sucesso dos plantios com árvores nativas e, conseqüentemente, um melhor resultado nos

programas de reflorestamento.

Diante disso, este estudo teve como objetivo verificar a influência do processo de rustificação sob sol pleno implementado em viveiros sobre parâmetros morfológicos, fisiológicos e bioquímicos de mudas de duas espécies arbóreas de diferentes grupos sucessionais, utilizadas em programas de reflorestamento de Floresta Estadual Semidecidual. Foram levantadas duas questões: **(1)** Com o método de aclimação sob sol pleno implementado em viveiros florestais, são obtidas mudas mais rústicas e de maior qualidade? **(2)** São induzidas mudanças nos parâmetros bioquímicos com o aumento da luminosidade?

MATERIAL E MÉTODOS

LOCAL DE ESTUDO, ESPÉCIES E CONDIÇÕES DE CULTIVO

O experimento foi realizado em viveiro florestal pertencente ao Laboratório de Biodiversidade e Restauração de Ecossistemas (LABRE) da Universidade Estadual de Londrina (UEL), Londrina, PR, Brasil (23°19'28"S, 51°11'54"O, 602 m altitude). Foram escolhidas duas espécies arbóreas empregadas em programas de reflorestamento de Floresta Estacional Semidecidual, as quais são de grupos sucessionais distintos. *Heliocarpus popayanensis* Kunth (Malvaceae) (Figura 1A), conhecida popularmente como jangadeiro, pau-jangada, algodoeiro ou jangada-brava, é classificada como espécie heliófita e pioneira, sendo encontrada em sucessão inicial (Lorenzi, 2002). Já a espécie *Cariniana estrellensis* (Raddi) Kuntze (Lecythydaceae) (Figura 1B) é conhecida popularmente como jequitibá-branco e caracteriza-se como secundária tardia e semidecídua, sendo encontrada em sucessão tardia (Lorenzi, 2002). É tolerante à sombra, apesar de atingir o dossel (Lorenzi, 2002).

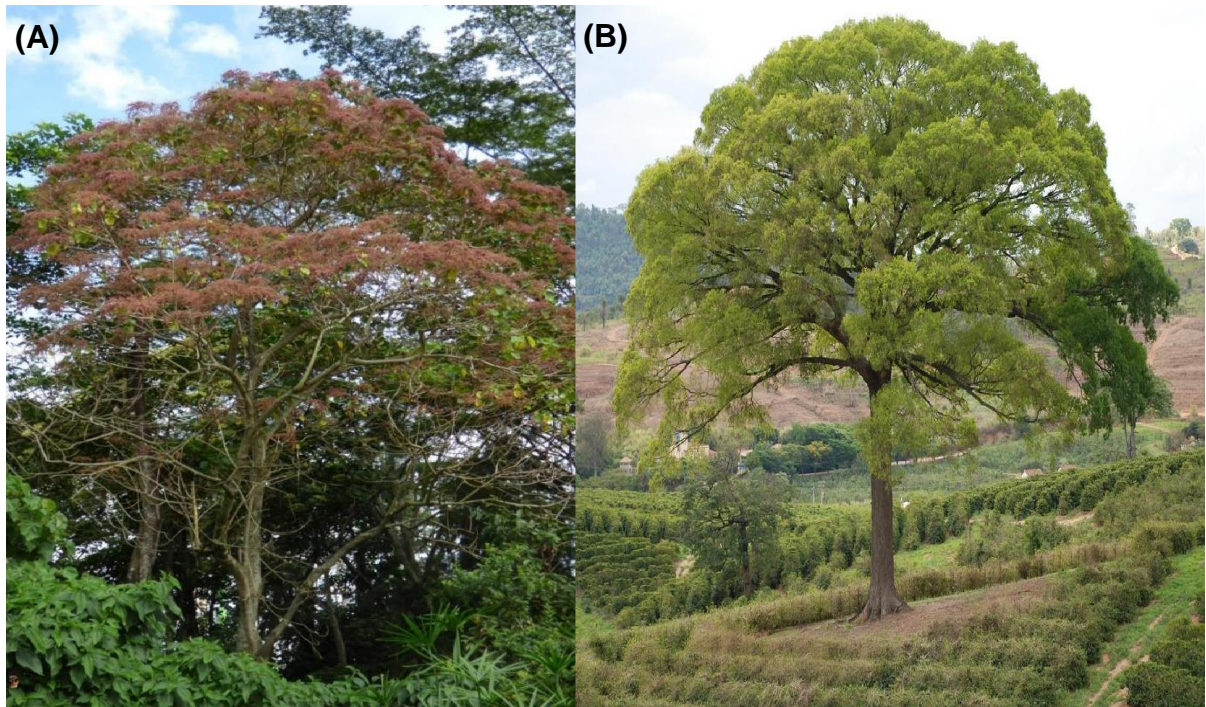


Figura 1 – Indivíduos adultos de *Heliocarpus popayanensis* (A) e *Cariniana estrellensis* (B).

Os experimentos foram realizados, concomitantemente para ambas as espécies, entre os meses de dezembro de 2017 (Temperatura média = 24 °C; precipitação acumulada = 286 mm; umidade relativa média = 71,81%) e janeiro de 2018 (Temperatura média = 23 °C; precipitação acumulada = 408,9 mm; umidade relativa média = 81,8%) (IAPAR - Agrometeorologia – Dados diários de Londrina – 2017 e 2018).

Foi adotado o método usual de produção de mudas do viveiro, que possui três etapas. Primeiramente, as sementes foram colocadas para germinação em areia. Em seguida, as plântulas foram transplantadas individualmente em tubetes de 50 mL contendo substrato a base de composto orgânico peneirado formado por substrato vegetal e areia (proporção 9:1), além de grânulos de Osmocote® (5 g.L⁻¹ substrato), um fertilizante de liberação lenta (14% de N, 14% de P₂O₅ e 14% de K₂O). Cerca de 50 mudas foram mantidas no setor de crescimento, sob sombreamento parcial com auxílio de telas de propileno (“sombrite”). Elas permaneceram nesse setor até atingirem cerca de 15-20 cm de altura. Finalmente, metade das mudas foram transferidas para o setor de rustificação, a pleno sol, para aclimação. Elas foram mantidas por 6 semanas neste setor (período usual de aclimação no viveiro). A outra metade das mudas foi mantida no setor de crescimento, como controle. Não houve mudanças no regime de irrigação das mudas com a troca de setor no viveiro (4

irrigações ao dia, por meio de aspersores, com duração de 30 minutos cada irrigação). A irradiância máxima avaliada no viveiro em dias ensolarados foi de aproximadamente 710 e 1.800 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ para plantas sob condições de sombra e pleno sol, respectivamente (Calzavara et al., 2017).

AVALIAÇÕES MORFOLÓGICAS

Ao final do experimento, foram analisadas variáveis morfológicas de 12 mudas. O diâmetro do caule foi medido na altura da borda do tubete e a espessura de folha foi medida no limbo foliar da folha mais nova completamente expandida, evitando as nervuras. Em ambos os casos, utilizou-se um paquímetro digital. A altura e o comprimento da raiz foram medidos com o auxílio de régua milimetrada e a área foliar total (AF), com um integrador de área foliar portátil modelo LI-3000CAP (LiCor Inc., Lincoln, NE, EUA). Para a determinação das massas secas foliar (MSF), caulinar (MSC) e radicial (MSR), os diferentes órgãos das mudas foram separados e acondicionados em sacos de papel, sendo secos em estufa a 60°C até atingirem peso constante. Após a coleta dos dados morfológicos, foram calculadas as massas secas de parte aérea (MSPA=MSF+MSC) e total (MST=MSPA+MSR) e a área foliar específica (AFE=AF/MSF). Também foram calculados índices relacionados à qualidade de mudas, como a razão parte aérea/raiz (RPAR=MSPA/MSR), razão altura/diâmetro (RAD) e o índice de qualidade de Dickson (IQD=MST/(RAD+RPAR)), segundo Dickson et al. (1960).

AVALIAÇÕES FISIOLÓGICAS

As variáveis fisiológicas de 10 mudas foram analisadas na semana precedente à desmontagem do experimento, utilizando-se a folha mais nova completamente expandida. As análises de trocas gasosas foram realizadas no início da manhã de dias ensolarados (para determinação da assimilação fotossintética máxima), utilizando um analisador portátil de gás infravermelho (Irga) modelo LICOR 6400 XT (LiCor Inc., Lincoln, NE, EUA) conectado a uma câmara 6 cm² com fonte de luz de LED ajustada para a DFFF de 1.900 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, suficiente para saturar a fotossíntese das mudas das duas espécies. Foram obtidas a taxa fotossintética líquida (A), condutância estomática (g_s), concentração intercelular de CO₂ (C_i), transpiração (E), eficiência no uso da água (EUA = A/E) e eficiência instantânea de carboxilação ($k=$

A/Ci) das mudas.

A fluorescência da clorofila foi avaliada utilizando um fluorômetro OS1p (Opti-Sciences Inc., Hudson, EUA), permitindo verificar a existência de fotoinibição, conforme descrito por Shimizu et al. (2006). As folhas intactas foram adaptadas ao escuro por 10 min e a eficiência máxima do fotossistema II foi determinada pela determinação da razão F_v/F_m . As análises foram feitas ao amanhecer (para determinação da fotoinibição crônica) e ao meio-dia (para determinação da fotoinibição dinâmica).

AVALIAÇÕES BIOQUÍMICAS

Para as análises bioquímicas, durante a desmontagem do experimento foram coletadas as folhas mais novas completamente expandidas de 5 mudas diferentes das demais análises. As coletas foram realizadas no período da manhã e os protocolos foram todos padronizados para cada espécie vegetal estudada.

Parâmetros que indicam a ocorrência de estresse oxidativo foram mensurados no mesmo dia da coleta das folhas através da dosagem de H_2O_2 e da peroxidação lipídica. Para isso, 100 mg de folha foram coletados e macerados em N_2 líquido, adicionados metanol e ácido tricloroacético (TCA) 0,2%, e o extrato obtido foi centrifugado a 15644 xg a 4°C por 5 minutos. A peroxidação lipídica foi determinada pela dosagem de TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico), na qual o sobrenadante foi submetido à reação a 60°C com o ácido tiobarbitúrico ($C_4H_4N_2O_2S$) na presença de TCA, seguindo a metodologia descrita por Federici et al. (2007). Para a dosagem do H_2O_2 , o sobrenadante foi submetido à reação com KI 1M e tampão fosfato, mantido no gelo e no escuro por uma hora para posterior análise da absorbância a 390 nm, seguindo a metodologia de Alexieva et al. (2001). Ambas as leituras foram realizadas em leitor de microplacas Victor TM 3 (Perkin Elmer, Turku, Finlândia).

Também foram determinadas as atividades de enzimas antioxidantes das folhas. Para isso, 100 mg de folha foram coletadas e maceradas em N_2 líquido e adicionado o tampão fosfato de potássio para extração (100 mM; pH 7,5) contendo EDTA 1 mM e PVPP 2%. O extrato obtido foi centrifugado a 15644 xg a 4°C por 15 minutos e feitas alíquotas de 100 μL , que foram congeladas em freezer -80°C.

A atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) foi avaliada conforme a metodologia de Giannopolitis; Ries (1977), com modificações. Foi preparado um tampão de reação contendo o tampão de extração (50 mM), metionina (13 mM), EDTA (0,1 mM), NBT (75 μ M) e riboflavina (2 μ M), e o pH ajustado para 7,8. Os reagentes foram protegidos da luz. Foram montadas 2 reações em tubos de ensaio separados, adicionando 1960 μ L de tampão + 40 μ L de extrato enzimático: uma reação foi mantida no escuro (branco do escuro) e a outra colocada em uma caixa adaptada com 3 lâmpadas fluorescentes de 25 W cada, ligadas durante 10 minutos, juntamente com o branco da luz, que continha somente 2000 μ L do tampão de reação. Após os 10 minutos, as leituras das absorbâncias foram realizadas em espectrofotômetro. Para o cálculo da atividade da enzima, considerou-se uma unidade de SOD a quantidade de enzima requerida para inibir 50% da fotoredução do NBT.

A atividade da enzima Ascorbato peroxidase (APX) foi avaliada conforme a metodologia de Nakano; Asada (1981), com modificações. Foi preparado um tampão de reação contendo tampão fosfato 50 mM (pH 7) e EDTA 0,1 mM. Esse tampão foi dividido e em uma das partes foi adicionado ácido ascórbico 0,5 mM. As reações foram montadas diretamente em cubeta de quartzo, onde para o branco foi adicionado o extrato enzimático, completando o volume para 3 mL com tampão fosfato 50 mM sem ácido ascórbico. Para a reação enzimática, foi adicionado o extrato enzimático, completando o volume para 3 mL com tampão fosfato 50 mM com ácido ascórbico e, por último, foi adicionado H₂O₂ 30 mM. A leitura foi realizada em espectrofotômetro no modo cinética a 290 nm por 2 minutos. A atividade da enzima foi determinada utilizando o coeficiente de extinção molar de 2,8 mM cm⁻¹ referente ao ascorbato do meio.

Já a atividade das enzimas Peroxidases (POD) foi avaliada conforme a metodologia de Peixoto et al. (1999), com modificações. Foi preparado um tampão de reação contendo tampão fosfato 25 mM, pirogalol 20 mM, H₂O₂ 20 mM e o pH acertado para 6,8. Para a reação enzimática, foi utilizado o extrato enzimático, completando o volume para 2 mL com tampão de reação. Em todos os casos, 200 μ L de H₂SO₄ foram adicionados cuidadosamente após 1 minuto para parar a reação. As leituras foram realizadas após as reações esfriarem, em espectrofotômetro a 420 nm. A atividade da enzima foi calculada usando o coeficiente de extinção molar de 2,47 mM cm⁻¹ referente ao pirogalol do meio.

Os extratos obtidos para análise da atividade das enzimas antioxidantes também foram utilizados para determinar o conteúdo de proteínas totais com o reagente Coomassie Brilliant Blue G-250 da Bio-Rad, seguindo as especificações do fabricante (Bradford, 1976).

Para a extração dos pigmentos fotossintéticos, as folhas foram colocadas em uma solução de acetona 80% diluída em tampão fosfato de sódio 2,5 mM (pH 7,8) e mantidas durante 15 dias em geladeira (5°C), protegidos da luz. Os teores de carotenóides e de clorofilas *a* e *b* foram determinados através da análise das absorvâncias em 470, 646,8 e 663,2 nm e as concentrações dos pigmentos calculadas por meio das equações propostas por Wellburn (1994).

Foram quantificados também os compostos fenólicos totais e flavonoides totais. Para a extração, foram macerados 100 mg de folhas em N₂ líquido, adicionados 2,5 mL de metanol 80% e as amostras transferidas para tubos falcon, permanecendo por 1 hora em agitador orbital a 180 rpm a temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 1738 xg, a 4°C por 15 minutos, e feitas alíquotas, que foram mantidas a -20°C até o momento das análises.

Para a dosagem dos fenóis totais foi construída uma curva analítica com padrão de ácido gálico. Foi seguida a metodologia de Swain; Hillis (1959), com modificações na concentração das amostras. Para as reações, as amostras foram diluídas e utilizou-se 250 µL da diluição da amostra + 1,25 mL do reagente Folin-Ciocalteu diluído (1:10), deixando reagir por 5 minutos, e então adicionado 1 mL de Na₂CO₃ 7,5%, deixando reagir por 30 minutos no escuro. O espectrofotômetro foi zerado com a solução extratora e as leituras realizadas a 765 nm.

Para a dosagem dos flavonoides totais foi construída uma curva analítica com padrão de quercetina. Foi seguida a metodologia de Lee et al. (1995), com modificações na concentração das amostras. Para as reações, as amostras foram diluídas e utilizou-se 250 µL da diluição da amostra + 1 mL de água destilada + 75 µL de NaNO₂, deixando reagir durante 6 minutos. Foram adicionados então 150 µL de AlCl₃ + 500 µL de NaOH, deixando reagir por 15 minutos no escuro. O espectrofotômetro foi zerado com a solução extratora e as leituras realizadas a 425 nm.

Em todas as análises espectrofotométricas, a leitura das absorvâncias foi realizada utilizando-se um espectrofotômetro GENESYS 10S UV-Vis (Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts - USA).

Para a análise do conteúdo de S-nitrosotióis (RSNO) e nitrito (NO_2^-), visando avaliar a disponibilidade de NO das folhas, foram coletados 100 mg de folhas. Estas foram maceradas em 1 mL de água deionizada e colocadas em banho ultrassom por 20 minutos. Os protocolos de detecção de RSNO e NO_2^- foram realizados utilizando técnica amperométrica (Santos et al., 2016), utilizando o amperômetro WPI TBR4100/1025 (World Precision Instruments Inc., Sarasota, Flórida, EUA) acoplado a um sensor específico de NO (ISO-NOP 2 mm). Alíquotas de 0,2 mL da suspensão de folhas foram adicionadas no compartimento de amostragem contendo 10 mL da solução de cloreto de cobre II (CuCl_2 , 0,1 M), para o protocolo de detecção de RSNO. Esse meio redutor permite a detecção de NO livre a partir do conteúdo de RSNO presentes na suspensão foliar. Já para a detecção de NO_2^- , utilizou-se uma solução de iodeto de potássio (KI, 0,1 M) em ácido sulfúrico (H_2SO_4 , 0,1 M) para reduzir o NO_2^- em NO livre. As análises foram realizadas em duplicata e as curvas de calibração foram realizadas a partir da S-nitrosoglutationa (GSNO) recém preparada para o protocolo de detecção de RSNO e nitrito de sódio (NaNO_2) para o protocolo de detecção de NO_2^- .

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a avaliação das mudas, 12 repetições foram utilizadas para as análises morfológicas, 10 para as fisiológicas e 5 para as bioquímicas (com exceção da análise do conteúdo RSNO e NO_2^- , em que foram utilizadas 6 repetições). Os dados foram verificados quanto à normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk, homocedasticidade pelo teste de Bartlett e submetidos à análise de variância (ANOVA) ao nível de 5% de probabilidade. Quando não atingidas as premissas, os dados foram transformados pela função box-cox. Para a variável F_v/F_m foi realizada uma ANOVA de dois fatores (período x condição de luminosidade), seguidas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Todas as análises foram feitas no programa R, versão 3.5.1 (R Development Core Team, 2018).

O índice de plasticidade fenotípica (IP), que variou de 0 a 1, foi calculado para cada variável usando as médias de cada um dos dois tratamentos, segundo Valladares et al. (2000): $\text{IP} = (\text{média menor} - \text{média maior})/\text{média maior}$.

RESULTADOS

Com relação às características morfológicas utilizadas na avaliação de mudas, para ambas as espécies verificou-se que a rustificação sob sol pleno estimulou o espessamento das folhas e o incremento das massas secas de parte aérea, raiz e total (Tabela 1). Além disso, foram observados efeitos positivos nas variáveis indicativas de qualidade de mudas tanto para *H. popayanensis* quanto *C. estrellensis*, havendo redução da RAD, da AFE e da RPAR e aumento no IQD para as mudas aclimatadas.

A espécie pioneira foi mais plástica em relação à espessura de folha (0,50), RAD (0,36) e AFE (0,53), enquanto a espécie não-pioneira apresentou maiores IP para os parâmetros de massas secas de parte aérea (0,23); raiz (0,53) e total (0,33), além da RPAR (0,36) e IQD (0,49).

A redução da área foliar e do comprimento da parte aérea induzida pela aclimação foi observada somente em *H. popayanensis*, enquanto o aumento no diâmetro do caule sob sol pleno só ocorreu em mudas de *C. estrellensis*. Ambas as espécies foram plásticas ao processo de rustificação. Contudo, em um contexto geral, foi observada maior plasticidade para a espécie pioneira, que obteve um IP médio de 0,30, enquanto para a espécie tardia o IP médio foi de 0,23. Os maiores valores de IP para *H. popayanensis* indicam que nesta espécie as mudanças morfológicas induzidas pelo sol pleno foram maiores.

Tabela 1 - Média \pm erro padrão (n=12) de atributos morfológicos e respectivos índices de plasticidade de mudas de *Heliocarpus popayanensis* (Hp) e *Cariniana estrellensis* (Ce) cultivadas no setor de crescimento (Sombra) e no setor de rustificação (Sol pleno). RPAR= razão parte aérea/raiz; RAD= razão altura/diâmetro; IQD= índice de qualidade de Dickson; AFE= área foliar específica. Diferenças significativas (ANOVA; $p < 0,05$) entre os tratamentos para cada espécie estão indicadas com asterisco.

Variável	Espécie -	Tratamento		Índice de plasticidade
		Sombra	Sol pleno	
Área foliar (cm ²)	Hp	77,7 \pm 7,97	45 \pm 2,20*	0,42
	Ce	147 \pm 7,55	145 \pm 9,05	0,02
Comprimento parte aérea (cm)	Hp	18,8 \pm 0,88	13,4 \pm 18,79*	0,29
	Ce	12,7 \pm 0,30	14,1 \pm 0,69	0,10
Diâmetro do caule (mm)	Hp	3,77 \pm 0,13	4,08 \pm 0,09	0,08
	Ce	3,47 \pm 0,11	4,14 \pm 0,16*	0,16
Espessura da folha (mm)	Hp	0,08 \pm 0,002	0,17 \pm 0,002*	0,50
	Ce	0,10 \pm 0,004	0,12 \pm 0,004*	0,18
Massa seca parte aérea (g)	Hp	0,39 \pm 0,03	0,50 \pm 0,02*	0,22
	Ce	0,81 \pm 0,03	1,06 \pm 0,09*	0,23
Massa seca raiz (g)	Hp	0,15 \pm 0,01	0,25 \pm 0,01*	0,37
	Ce	0,19 \pm 0,02	0,40 \pm 0,04*	0,53
Massa seca total (g)	Hp	0,60 \pm 0,06	0,77 \pm 0,04*	0,23
	Ce	0,97 \pm 0,06	1,46 \pm 0,11*	0,33
RPAR (g g ⁻¹)	Hp	2,51 \pm 0,08	2,08 \pm 0,11*	0,17
	Ce	4,11 \pm 0,37	2,62 \pm 0,20*	0,36
RAD (cm mm ⁻¹)	Hp	5,04 \pm 0,28	3,23 \pm 0,16*	0,36
	Ce	3,77 \pm 0,15	3,29 \pm 0,14*	0,13
IQD	Hp	0,08 \pm 0,08	0,15 \pm 0,01*	0,45
	Ce	0,12 \pm 0,01	0,24 \pm 0,02*	0,49
AFE (cm ² g ⁻¹)	Hp	449 \pm 11,2	212 \pm 3,5*	0,53
	Ce	290 \pm 7,47	229 \pm 6,2*	0,21
Média IP	Hp			0,30
	Ce			0,23

Pelas análises de trocas gasosas, nota-se um aumento da g_s (Figura 2A), da A (Figura 2B) e da k (Figura 2C) para as mudas da espécie pioneira em sol pleno em relação às mantidas na sombra, enquanto esses parâmetros não se alteraram em mudas de *C. estrellensis*. Em *H. popayanensis*, foi possível observar uma queda na C_i nas plantas cultivadas sob sol pleno, enquanto para *C. estrellensis* a C_i foi maior em mudas mantidas na mesma condição (Figura 2D). Não foram observadas diferenças na E para as mudas da espécie pioneira, diferentemente de *C. estrellensis*, que apresentou um aumento da E em mudas cultivadas sob sol pleno (Figura 2E). Por fim, para a espécie pioneira, não houve diferenças na EUA das plantas mantidas sob sol pleno; entretanto, na espécie *C. estrellensis* foi observada uma queda deste parâmetro neste mesmo tratamento (Figura 2F).

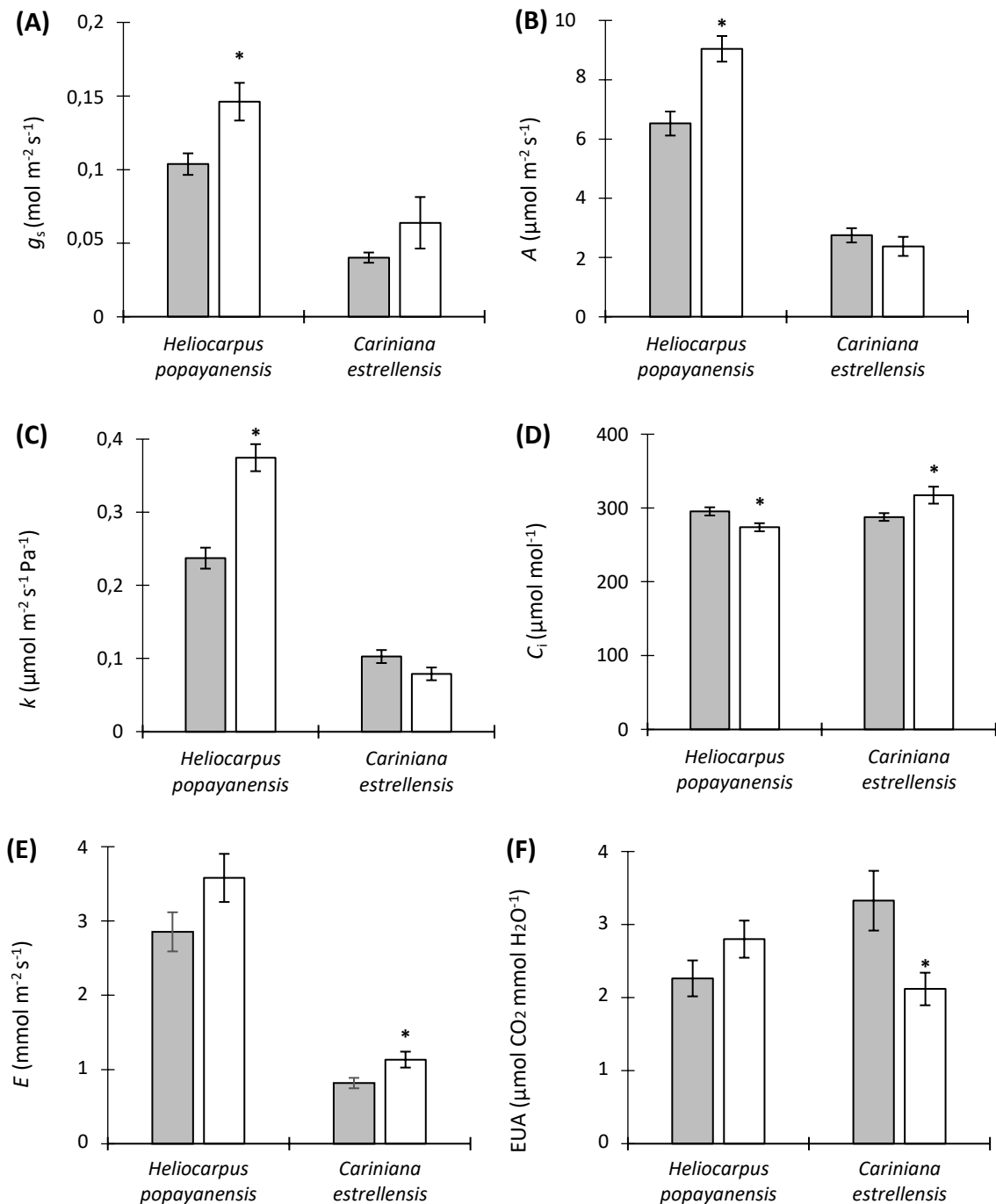


Figura 2 - Médias de trocas gasosas de mudas de *Heliocarpus popayanensis* e *Cariniana estrellensis* mantidas na sombra (barras cinzas) em contraste com as transferidas para o sol pleno (barras brancas). **(A)** Condutância estomática (g_s); **(B)** Fotossíntese líquida (A); **(C)** Eficiência instantânea de carboxilação (k); **(D)** Concentração intercelular de CO_2 (C_i); **(E)** Taxa transpiratória (E); **(F)** Eficiência no uso da água (EUA). Diferenças significativas (ANOVA; $p < 0,05$) entre os tratamentos estão indicadas com asterisco. Traços em cima das barras correspondem ao erro padrão ($n=10$).

Pela análise de fluorescência da clorofila *a* (Figura 3) ambas as espécies mantiveram o F_v/F_m alto (próximo de 0,8) durante o amanhecer, para as duas condições de luminosidade (sombra e sol pleno). Ao meio-dia, ambas as espécies

apresentaram um decréscimo do F_v/F_m (próximo de 0,6) para as mudas cultivadas sob Sol pleno.

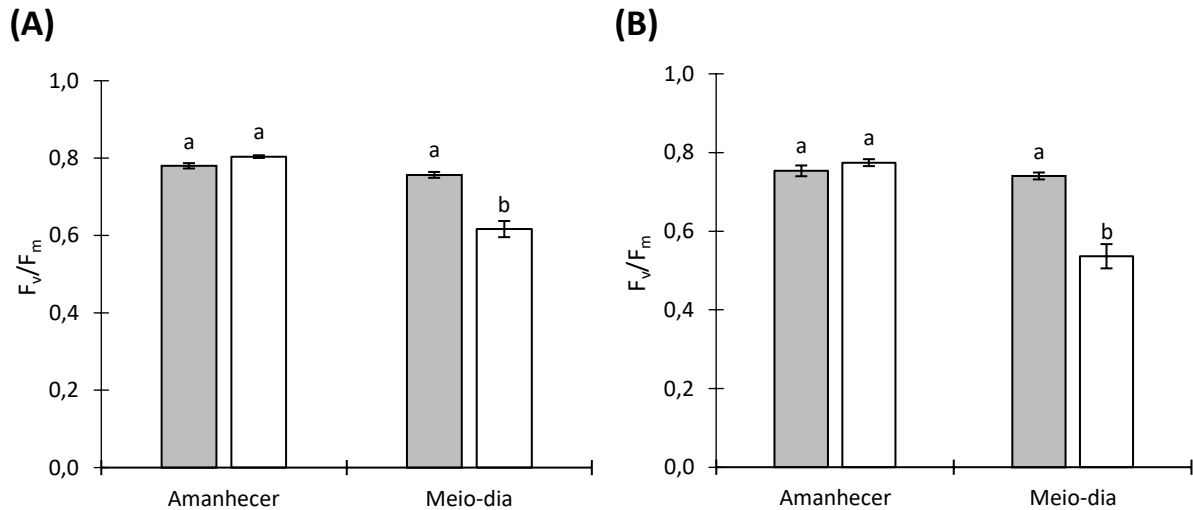


Figura 3 - Eficiência máxima do fotossistema II (F_v/F_m) de mudas de **(A)** *Heliocarpus popayanensis* e **(B)** *Cariniana estrellensis* mantidas na sombra (barras cinzas) em contraste com as transferidas para o sol pleno (barras brancas), ao amanhecer e ao meio-dia. A interação entre os fatores (período x condição de luminosidade) foi significativa, apresentando $F= 47,88$; $p= 0,00$ para *H. popayanensis* e $F= 22,74$; $p= 0,00$ para *C. estrellensis*. Tratamentos com letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Traços sobre as barras correspondem ao erro padrão ($n=10$).

Os níveis de H_2O_2 foram maiores nas folhas de plantas sob sol pleno das duas espécies, ao passo que os níveis de clorofilas totais foram maiores nas plantas mantidas sob sombreamento. Para as mudas de *H. popayanensis*, o cultivo sob sol pleno levou ao aumento dos níveis foliares de compostos fenólicos totais, dos flavonoides totais e de proteínas e da atividade da enzima SOD nas folhas. Para a espécie *C. estrellensis*, foram observados maiores níveis de carotenoides nas folhas de plantas de sombra. A peroxidação lipídica e as atividades das enzimas APX e POD não apresentaram diferenças entre as plantas sob diferentes intensidades luminosas para nenhuma das espécies estudadas (Tabela 2).

É notável que *H. popayanensis* foi bioquimicamente mais plástica que *C. estrellensis*. A espécie pioneira apresentou maiores IP para quase todos os parâmetros bioquímicos em relação à espécie não-pioneira.

Tabela 2 - Média \pm erro padrão (n=5) de variáveis bioquímicas de mudas de *Heliocarpus popayanensis* (Hp) e *Cariniana estrellensis* (Ce) cultivadas no setor de crescimento (sombra) e no setor de rustificação (sol pleno). Diferenças significativas (ANOVA; $p < 0,05$) entre os tratamentos estão indicadas com asterisco. APX= Atividade Ascorbato peroxidase; POD= Atividade Peroxidases; SOD= Atividade Superóxido dismutase; TBARS= Peroxidação lipídica; H₂O₂= Peróxido de Hidrogênio.

Variável	Espécie	Tratamento		Índice de plasticidade
		Sombra	Sol pleno	
Fenóis totais (mg g ⁻¹ MF)	Hp	3,61 \pm 0,41	14,3 \pm 0,94*	0,75
	Ce	68,1 \pm 4,80	59,9 \pm 4,49	0,12
Flavonoides totais (mg g ⁻¹ MF)	Hp	5,52 \pm 0,78	23,5 \pm 1,47*	0,76
	Ce	50,3 \pm 3,43	46,5 \pm 2,50	0,08
APX (μ mol min ⁻¹ g ⁻¹ MF)	Hp	6,02 \pm 0,82	6,43 \pm 0,86	0,06
	Ce	2,88 \pm 0,53	3,36 \pm 0,60	0,14
POD (μ mol min ⁻¹ g ⁻¹ MF)	Hp	3632 \pm 506,83	4117 \pm 235,8	0,12
	Ce	263 \pm 32,39	201 \pm 31,1	0,23
SOD (U g ⁻¹ MF)	Hp	227 \pm 65,16	626 \pm 24,63*	0,64
	Ce	352 \pm 19,69	384 \pm 9,15	0,08
TBARS (nmol MDAg ⁻¹ MF)	Hp	30,2 \pm 5,26	37 \pm 2,67	0,18
	Ce	56,7 \pm 5,60	57 \pm 3,88	0,01
H ₂ O ₂ (mg g ⁻¹ MF)	Hp	3,63 \pm 0,73	9,69 \pm 0,29*	0,65
	Ce	5,87 \pm 0,36	8,72 \pm 0,68*	0,36
Clorofilas totais (mg g ⁻¹ MF)	Hp	2,04 \pm 0,35	0,69 \pm 0,07*	0,66
	Ce	1,82 \pm 0,01	0,87 \pm 0,01*	0,52
Carotenoides (mg g ⁻¹ MF)	Hp	0,14 \pm 0,09	0,25 \pm 0,07	0,45
	Ce	0,52 \pm 0,01	0,43 \pm 0,01*	0,17
Proteínas (mg g ⁻¹ MF)	Hp	8,01 \pm 0,26	9,40 \pm 0,14*	0,15
	Ce	1,90 \pm 0,37	2,27 \pm 0,44	0,16
Média IP	Hp			0,47
	Ce			0,19

As mudas de *H. popayanensis* cultivadas sob sol pleno mostraram níveis foliares de NO₂⁻ e de RSNO aumentados em relação às plantas mantidas na sombra (Figura 4A e 4B). As mudas de *C. estrellensis* apresentaram maiores quantidades de NO₂⁻ nas plantas cultivadas na sombra e nenhuma diferença nos níveis de RSNO entre os tratamentos (Figura 4B).

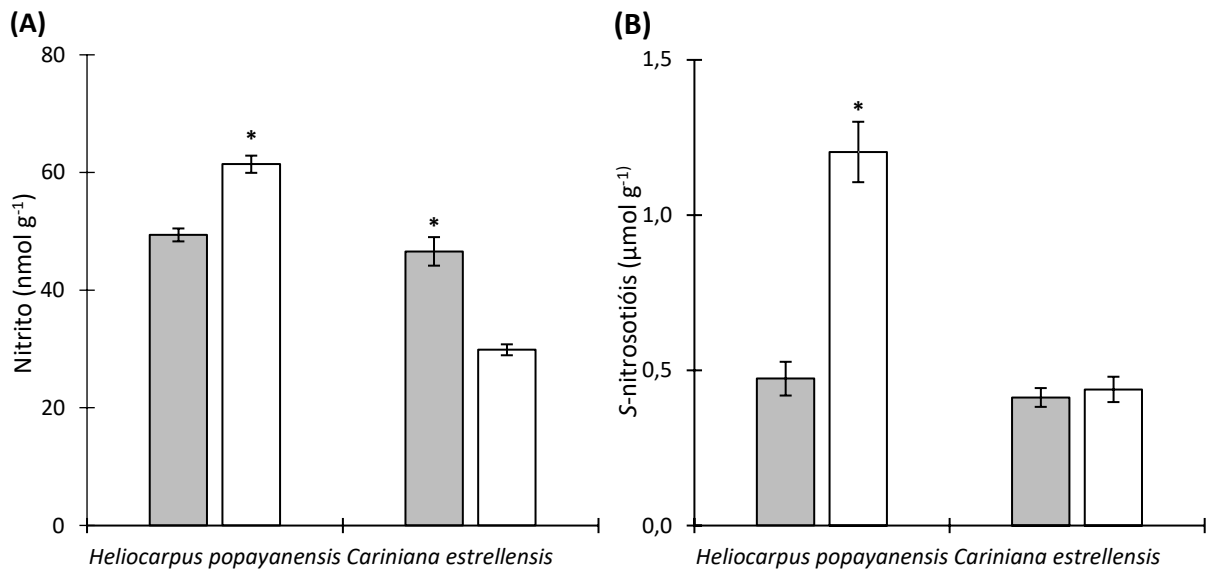


Figura 4 – (A) Níveis de nitrito; **(B)** e de S-nitrosotiois ($\mu\text{mol g}^{-1}$) em *Heliocarpus popayanensis* e *Cariniana estrellensis*, respectivamente, mantidas na sombra (barras cinzas) em contraste com as transferidas para o sol pleno (barras brancas). Diferenças significativas (ANOVA, $p < 0,05$) entre os tratamentos estão indicadas com asterisco. $n=6$. Traços sobre as barras correspondem ao erro padrão.

DISCUSSÃO

A partir das respostas apresentadas pelas mudas de *H. popayanensis* (pioneira) e *C. estrellensis* (não pioneira) ao sol pleno, foi possível verificar o desenvolvimento de características que tornam as plantas mais rústicas. Além disso, foi possível observar uma maior plasticidade da espécie pioneira ao aumento na intensidade luminosa.

Depois que as mudas de ambas as espécies foram transferidas do setor de crescimento para o setor de rustificação (sol pleno), estas apresentaram maiores valores de algumas medidas de crescimento, principalmente em relação às massas secas, quando comparadas às mudas mantidas no setor de crescimento (sombra). Estes resultados são amplamente evidenciados em literatura com espécies arbóreas (Kamaluddin; Grace, 1993; Scalon et al., 2003; Martinazzo et al., 2007; Gama, 2013). A radiação pode afetar a produção e partição de biomassa para os órgãos da planta, bem como alterar a morfologia e composição destes (Maule et al., 1995).

Foram observados efeitos positivos em variáveis indicativas de qualidade de mudas. Tanto para *H. popayanensis* quanto *C. estrellensis*, houve a redução da AFE, RAD e RPAR, e o aumento no IQD para as mudas rustificadas. Estes resultados corroboram os obtidos por Pacheco et al. (2013), estudando mudas de *Ceiba*

speciosa Ravenna. Uma alta RAD indica mudas estioladas que provavelmente teriam problemas em sustentar sua parte aérea após o plantio em campo (Pacheco et al., 2013). Para reflorestamentos, mudas com menor RAD são favoráveis, visto que, com maior diâmetro podem suportar mais danos físicos (Cleary et al., 1978). Além disso, estas devem dispor de mais nutrientes e carboidratos armazenados (Johnson et al., 2009), os quais estão disponíveis para suprir a demanda das plantas (Salifu; Timmer, 2001) até que o contato entre raiz e solo seja restabelecido, permitindo a exploração dos recursos (Jacobs et al., 2005).

Para a utilização das mudas em programas de reflorestamento, menores valores da RPAR também podem indicar que as plantas rustificadas são mais adequadas para o plantio do que as cultivadas na sombra (Calzavara et al., 2015). Plantas que apresentam menor RPAR devem ter proporcionalmente melhor acesso à água e nutrientes, o que, associado à redução da transpiração total das mudas (considerando a menor área foliar total), permitiria uma aclimatação efetiva após o transplante ao campo (Moraes et al., 2010). De acordo com Poorter; Nagel (2000), uma elevada RPAR pode indicar restrição espacial do crescimento radicial e a perda do equilíbrio entre o desenvolvimento radicial e a parte aérea. Neste caso, as raízes não forneceria água suficiente à parte aérea (Poorter; Nagel, 2000), visto que a taxa de transpiração é alta em plantas com grande biomassa aérea (Harvey; van den Driessche, 1997).

As maiores diferenças nas medidas de crescimento entre os dois tratamentos foram encontradas em *H. popayanensis*. Contudo, ao contrário do conceito pré-estabelecido de que espécies tolerantes à sombra não toleram alta irradiância (Swaine; Whitmore, 1988), as mudas de *C. estrellensis*, que é uma espécie de dossel, sobreviveram e cresceram melhor sob sol pleno. No trabalho realizado por Souza; Válio (2003) utilizando 15 espécies de árvores tropicais brasileiras foi constatado que o crescimento, em geral, foi menor em condições de sombreamento, com plantas apresentando menores valores de altura e massa seca total em relação às plantas cultivadas sob sol pleno. No presente estudo também foram constatados menores valores de massa seca nas plantas de ambas as espécies cultivadas sob sombreamento.

Foram observados menores valores para a altura das mudas de *H. popayanensis* cultivadas no setor de rustificação, como demonstrado também em outras espécies pioneiras (Gratzer et al., 2004; Calzavara et al., 2015; Mazzanatti et

al., 2016). Diferentemente da espécie pioneira, para a espécie tardia não foi observada uma influência do aumento de luminosidade no crescimento em altura, porém, houve espessamento do colo, o que resultou na redução da RAD, mesmo que esta tenha sido menor que a da pioneira. Os dados referentes à altura das mudas podem ser um indício de que a espécie pioneira sofre estiolamento na sombra, enquanto a espécie tardia sofre pouco ou nenhum. Isto está relacionado ao mecanismo de evitação à sombra mediado pelo fitocromo, que permite que as plantas intolerantes à sombra se aclimatem às mudanças na razão entre a luz vermelha e vermelho-extrema (Casal, 2012).

A rustificação das mudas das espécies estudadas também foi dependente da formação de novas folhas. Para a espécie pioneira, as folhas formadas sob alta intensidade luminosa expandiram-se menos e desenvolveram-se mais espessas. Variações na espessura dos tecidos foliares em função da intensidade luminosa são relatadas na literatura (Sabbi et al., 2010; Silva et al., 2010; Gama, 2013; Calzavara et al., 2015; Mazzanatti et al., 2016) e são associadas a mudanças estruturais que aumentam a eficiência no uso da água, uma vez que aumentam as taxas fotossintéticas por unidade de área foliar (Strauss-DeBenedetti; Berlyn, 1994; Rossatto; Kolb, 2010). No geral, como observado no presente estudo, a área foliar reduzida de folhas de sol é acompanhada por um maior espessamento do limbo, o que resulta na diminuição da AFE em comparação com folhas de sombra (Favaretto et al., 2011). A AFE é fortemente relacionada à taxa fotossintética e ao balanço de carbono da planta (Rozendaal et al., 2006). Esta relação pode ser observada neste estudo, no qual para a espécie pioneira, que foi a única a aumentar a *A*, a diminuição da AFE e o aumento da espessura foram mais acentuados. Em folhas de sombra, o aumento desse parâmetro tem sido interpretado como um mecanismo que favorece a captura de luz (Aranda et al., 2005; Favaretto et al., 2011). Contudo, a maior área por volume foliar, derivada da maior AFE, torna a folha menos eficiente no controle da perda de água sob condições hídricas limitantes (Aranda et al., 2005).

O aumento da intensidade luminosa estimulou a assimilação de carbono de *H. popayanensis*, conforme verificado pela análise de trocas gasosas. Yamashita et al. (2002), Oguchi et al. (2005), Calzavara et al. (2015) e Mazzanatti et al. (2016) também relataram aumento da taxa fotossintética em folhas submetidas ao aumento da intensidade luminosa. Esta característica propicia o rápido crescimento das plantas quando submetidas à intensidade luminosa elevada (Kursar; Coley, 1999). O aumento

da A é sustentado pela g_s destas mudas, que favoreceu maiores entradas de CO_2 nas câmaras subestomáticas das folhas das mudas cultivadas sob sol pleno. Apesar disso, foi observado um decréscimo da C_i , que pode ser explicado pela elevada A dessas mudas, visto que em ambientes muito iluminados a demanda pelo CO_2 é muito alta, diminuindo os seus níveis no mesófilo. A maior k pode estar relacionada ao aumento dos níveis de proteínas observados nas mudas de *H. popayanensis* cultivadas sob sol pleno, visto que ocorre uma maior alocação de N em proteínas fotossintéticas como a ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase-oxigenase (Rubisco). O suprimento de N determina a síntese de aminoácidos e proteínas e, em última análise, de todos os componentes celulares (Lawlor, 2002). Uma taxa rápida de assimilação de CO_2 requer altas quantidades de muitos componentes dos cloroplastos, particularmente os complexos de clorofila-proteína, transportadores de elétrons e componentes redutores de NADP^+ dos tilacoides, além da enzima de assimilação de CO_2 (Rubisco) (Lawlor, 2002). Em relação à EUA, a espécie pioneira não apresentou diferenças entre os tratamentos. Provavelmente, isso ocorre porque nesta espécie o aumento da taxa fotossintética contribui para reduzir os efeitos do excesso de luz durante a exposição à alta irradiação, devido à manutenção de uma alta eficiência fotoquímica do fotossistema II, que reduz os riscos de fotoinibição de suas folhas (Kitajima, 1994; Poorter, 1999; Krause et al., 2001; Cano et al., 2011; Calzavara et al., 2015).

Apesar de as mudas de *C. estrellensis* apresentarem menor AFE sob elevada irradiância, não foi verificado aumento da g_s ou da A , o que pode implicar que suas folhas não foram capazes de utilizar a luz extra sob condições mais iluminadas (Matos et al., 2009). De acordo com Sims; Pearcy (1992) e Yamashita et al. (2002), algumas espécies não apresentam aumento da taxa fotossintética máxima nas folhas maduras após a elevação da intensidade luminosa. Isto pode ocorrer, visto que conjuntamente à elevação de intensidade luminosa, há um aumento da temperatura foliar e do gradiente de pressão de vapor entre as folhas e a atmosfera circundante (Cano et al., 2011). Nestas condições, existe um balanço entre o aumento da fotossíntese, que é favorecida pelo aumento da irradiação, e a perda de água pelas folhas, que pode levar à dessecação (Sessa; Givnish, 2014). De fato isto pode ser observado neste estudo, visto que a espécie tardia apresentou uma queda na EUA sob sol pleno, que pode ser explicada pelas maiores taxas transpiratórias que as mudas apresentaram quando submetidas ao processo de rustificação, além das limitadas mudanças estruturais das

folhas destas mudas (as mudanças na espessura foliar e AFE foram discretas).

Isto não ocorreu nas mudas de *H. popayanensis*, que apresentaram mudanças estruturais mais acentuadas que devem ter contribuído para a manutenção das taxas transpiratórias quando transferidas para o setor de rustificação. Isto confirma a menor capacidade de espécies não pioneiras em tolerar o aumento da irradiância após o transplante em campos abertos (Siegert; Levia, 2011).

Kitao et al. (2006) demonstraram que mudas de algumas espécies tropicais transplantadas em áreas degradadas apresentaram fotoinibição crônica tanto em folhas maduras quanto em folhas novas, que se desenvolveram completamente sob alta luminosidade. Em contraste, ambas as espécies utilizadas no presente estudo foram capazes de resistir a alta intensidade de luz e não foi observada fotoinibição crônica, como evidenciado pela manutenção de um alto F_v/F_m ao amanhecer. A diminuição reversível do F_v/F_m que ocorreu em ambas as espécies provavelmente reflete a regulação dinâmica do excesso de energia absorvida relacionada à atividade do ciclo das xantofilas (fotoinibição dinâmica), como também observado em folhas jovens de *Vitis vinifera* (Bertamini; Nedunchezian, 2003) e de *Guazuma ulmifolia* (Calzavara et al., 2017). A alta capacidade de regulação dinâmica contribui para a proteção do sistema de transporte de elétrons e dos pigmentos fotossintéticos frente ao fotodano (Bertamini; Nedunchezian, 2003).

Os teores de pigmentos apresentaram diferenças entre as duas espécies. As mudas sob sombreamento apresentaram maior conteúdo dos pigmentos fotossintéticos, como clorofila total, para ambas as espécies, e carotenoides para *C. estrellensis*. Segundo Laisk et al. (2005), plantas desenvolvidas sob sol pleno investem menos em complexos coletores de luz, já que em alta irradiância as folhas absorvem mais energia que a capacidade de processamento do aparato fotossintético, o que pode levar à fotoinibição. Dessa forma, a diminuição da antena coletora de luz, ou seja, a redução dos teores de clorofila pode ser um mecanismo eficiente para reduzir o aporte de energia para os fotossistemas (Magalhães et al., 2009).

Dos parâmetros indicativos de estresse oxidativo analisados, foi observado o aumento dos níveis de H_2O_2 nas mudas mantidas sob sol pleno de ambas as espécies, sendo um indício da maior formação de ERO. Contudo, não foram detectados danos por peroxidação lipídica, indicando que estas mudas foram eficientes em se proteger

das ERO, o que está de acordo com o fato de nenhuma das espécies estudadas ter apresentado fotoinibição crônica.

Em *H. popayanensis*, a proteção contra ERO parece estar relacionada com compostos fenólicos, flavonoides e SOD. A alta irradiância e a radiação UV são importantes fatores que afetam a produção de flavonoides (Del Valle et al., 2018). Devido seu espectro de absorção de luz e propriedades antioxidantes, os flavonoides previnem danos aos aparatos fotossintéticos e ao DNA provocados pelo excesso de radiação solar (Treutter, 2006; Pollastri; Tattini, 2011; Landi et al., 2015). Para *C. estrellensis* não foram identificados os mecanismos pelos quais a espécie se protege dos danos oxidativos provocados pelo aumento da intensidade luminosa. Estes podem estar relacionados a antioxidantes não-enzimáticos, como ascorbato e glutathiona (GSH); contudo, são necessários estudos para investigar esses mecanismos.

O aumento da atividade da SOD nas mudas rustificadas de *H. popayanensis* pode explicar o acréscimo nos níveis de H_2O_2 nestas mudas, visto que a SOD catalisa a dismutação de $O_2^{\cdot-}$ gerado pelo estresse em uma das duas espécies menos nocivas: oxigênio molecular (O_2) ou H_2O_2 (Cassia et al., 2018). Além disso, uma das principais enzimas que degradam esta ERO é a APX, transformando o H_2O_2 em H_2O e O_2 (Cassia et al., 2018), porém, a atividade desta não foi significativamente diferente entre os tratamentos, podendo ser um dos motivos pelo qual houve o acúmulo de H_2O_2 nestas mudas. Também não foram observadas alterações dependentes da luz na atividade de APX em *Fagus sylvatica* Linnaeus cultivadas no campo (Peltzer; Polle, 2001).

O H_2O_2 atua também como uma molécula sinalizadora, desencadeando tolerância a vários estresses bióticos e abióticos (Quan et al., 2008). Nas mudas rustificadas de *H. popayanensis* as maiores concentrações de H_2O_2 , fenóis, flavonoides e a maior atividade da SOD podem estar relacionadas ao aumento dos níveis de NO nestas plantas. Isto porque os níveis de NO podem ser aumentados pelo H_2O_2 através da indução de atividades semelhantes à NR (nitrito redutase) / NOS (NO sintase) (Cassia et al., 2018). Neste estudo foram observados maiores níveis de NO_2^- e de S-nitrosotiois (RSNO) nas plantas rustificadas de *H. popayanensis*. Estudos com diferentes espécies vegetais demonstram que o NO induz a transcrição e a atividade de enzimas antioxidantes, como SOD, CAT e APX, em resposta ao estresse oxidativo (Shi et al., 2005; Zhang et al., 2009; Santa-Cruz et al., 2014; Cassia et al.,

2018). O NO pode atuar eliminando diretamente as ERO ou regulando enzimas antioxidantes que controlam os níveis tóxicos de ERO e ERN (espécies reativas de nitrogênio) (Song et al., 2006; Romero-Puertas et al., 2007; Bai et al. 2011). O NO pode modular o equilíbrio redox celular nas plantas através da regulação da expressão gênica, modificação pós-transducional ou ainda pela sua ligação ao grupo prostético heme de algumas enzimas antioxidantes (Cassia et al., 2018). Por atuar na síntese de enzimas como a fenilalanina amônia liase (PAL), o NO pode ativar a síntese de compostos secundários como as fitoalexinas, que incluem os flavonóides derivados da via dos fenilpropanoides, sendo importantes metabólitos de defesa (Durner et al. 1998; Kretschmar, 2007).

Para as mudas de *C. estrellensis*, não foi observado um aumento dos níveis de NO, o qual parece ser importante somente na resposta da espécie pioneira ao excesso de luz. São necessários mais estudos acerca do tema, visto que são raros os trabalhos com NO na resposta à luz e mais raros ainda os trabalhos que envolvem os mecanismos do NO na resposta de plantas arbóreas nativas.

CONCLUSÃO

O processo de rustificação mostra-se importante no desenvolvimento de mudas de arbóreas nativas que visam a melhora dos programas de reflorestamento, visto que as plantas adquiriram algumas características de tolerância que provavelmente favoreceriam seu estabelecimento após o plantio no campo. As características desenvolvidas por estas plantas quando submetidas ao processo de rustificação aumentam sua sobrevivência e, conseqüentemente, diminuem os elevados custos de replantios. Quando as mudas foram submetidas à alta irradiância, foram observadas diferentes respostas entre as espécies estudadas, mesmo que as mudas das duas espécies tenham sido capazes de se aclimatar às novas condições de luminosidade. Como esperado, as mudas da espécie pioneira demonstraram maior plasticidade e capacidade de resposta à nova condição de luminosidade, principalmente nos parâmetros bioquímicos. Contudo, os parâmetros morfológicos indicam que ambas as espécies se aclimataram ao sol pleno e formaram mudas de melhor qualidade.

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

REFERÊNCIAS

- Adams, W.W., Zarter, C.R., Ebbert, V., Demmig-Adams, B., 2004. Photoprotective strategies of overwintering evergreens. *AIBS Bulletin*. 54(1), 41-49. [https://doi.org/10.1641/0006-3568\(2004\)054\[0041:PSOOE\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1641/0006-3568(2004)054[0041:PSOOE]2.0.CO;2)
- Alexieva, V., Sergiev, I., Mapelli, S., Karanov, E., 2001. The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. *Plant Cell Environ.* 24(12), 1337-1344. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.2001.00778.x>
- Aranda, I., Castro, L., Pardos, M., Gil, L., Pardos, J.A., 2005. Effects of the interaction between drought and shade on water relations, gas exchange and morphological traits in cork oak (*Quercus suber* L.) seedlings. *For. Ecol. Manag.* 210(1-3), 117-129. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2005.02.012>
- Arasimowicz-Jelonek, M., Floryszak-Wieczorek, J., 2014. Nitric oxide, an effective weapon of the plant or the pathogen? *Mol. Plant Pathol.* 15(4), 406-416. <https://doi.org/10.1111/mpp.12095>
- Asada K., 1999. The water-water cycle in chloroplasts, scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50, 601-639. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.50.1.601>
- Asada, K., 2006. Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiol.* 141(2), 391-396. <https://doi.org/10.1104/pp.106.082040>
- Asgher, M., Per, T.S., Masood, A., Fatma, M., Freschi, L., Corpas, F.J., Khan, N.A., 2017. Nitric oxide signaling and its crosstalk with other plant growth regulators in plant responses to abiotic stress. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 24(3), 2273-2285. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7947-8>
- Bai, X., Yang, L., Tian, M., Chen, J., Shi, J., Yang, Y., Hu, X., 2011. Nitric oxide enhances desiccation tolerance of recalcitrant *Antiaris toxicaria* seeds via protein S-nitrosylation and carbonylation. *PLoS One* 6, e20714. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020714>
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Bertamini M., Nedunchezian N., 2003. Photoinhibition of photosynthesis in mature and young leaves of grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Plant Sci.* 164, 635-644. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(03\)00018-9](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(03)00018-9)
- Calzavara, A.K., Bianchini, E., Mazzanatti, T., Oliveira, H.C., Stolf-Moreira, R., Pimenta, J.A., 2015. Morphoanatomy and ecophysiology of tree seedlings in semideciduous forest during high-light acclimation in nursery. *Photosynthetica*, 53, 597-608. <https://doi.org/10.1007/s11099-015-0151-0>

Calzavara, A.K., Rocha, J.S., Lourenço, G., Sanada, K., Medri, C., Bianchini, E., Pimenta, J.A., Stolf-Moreira, R., Oliveira, H.C., 2017. Acclimation responses to high light by *Guazuma ulmifolia* Lam. (Malvaceae) leaves at different stages of development. *Plant Biol.* 19(5), 720-727. <https://doi.org/10.1111/plb.12592>

Cano, F.J., Sanchez-Gomez, D., Gasco, A., Rodriguez-Calcerrada, J., Gil, L., Warren, C.R., Aranda, I., 2011. Light acclimation at the end of the growing season in two broadleaved oak species. *Photosynthetica*, 49(4), 581-592. <https://doi.org/10.1007/s11099-011-0066-3>

Casal, J.J. 2012. Shade avoidance. *Arabidopsis Book*. 10, 0157 <https://doi.org/10.1199/tab.0157>

Cassia, R., Nocioni, M., Correa-Aragunde, N., Lamattina, L., 2018. Climate change and the impact of greenhouse gasses: CO₂ and NO, friends and foes of plant oxidative stress. *Front. Plant Sci.* 9, 273, 1-11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00273>

Cleary, B.D., Greaves, R.D., Owston, P.W., 1978. Seedlings. In: Cleary, B.D., Greaves, R.D., Hermann, R.K. (eds.). *Regenerating Oregon's forests*. Oregon State University Extension Service, Corvallis. pp. 63-98.

Craven, D., Dent, D., Braden, D., Ashton, M.S., Berlyn, G.P., Hall, J.S., 2011. Seasonal variability of photosynthetic characteristics influences growth of eight tropical tree species at two sites with contrasting precipitation in Panama. *For. Ecol. Manag.* 261(10), 1643-1653. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2010.09.017>

D'avila, F.S., Paiva, H.N.D., Leite, H.G., Barros, N.F.D., Leite, F.P., 2011. Efeito do potássio na fase de rustificação de mudas clonais de eucalipto. *Rev. Árvore.* 35(1), 13-19. <http://doi.org/10.1590/S0100-67622011000100002>.

Davis, A.S., Jacobs, D.F., 2005. Quantifying root system quality of nursery seedlings and relationship to outplanting performance. *New Forests*, 30(2), 295-311. <https://doi.org/10.1007/s11056-005-7480-y>

Del Valle, J.C., Buide, M.L., Whittall, J.B., Narbona, E., 2018. Phenotypic plasticity in light-induced flavonoids varies among tissues in *Silene littorea* (Caryophyllaceae). *Environ. Exp. Bot.* 153, 100-107. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2018.05.014>

Demmig-Adams, B., Adams III, W.W., 1992. Photoprotection and other responses of plants to high light stress. *Annu. Rev. Plant. Biol.* 43(1), 599-626. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.43.060192.003123>

Dickson, A., Leaf, A.L., Hosner, J.F., 1960. Quality appraisal of white spruce and white pine seedling stock in nurseries. *Forest. Chron.* 36(1), 10-13. <https://doi.org/10.5558/tfc36010-1>

Durner, J.; Wendehenne, D.; Klessig, D.F., 1998. Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 10328-10333. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.17.10328>

- Estringu, A., Aksakal, O., Tabay, D., Kara, A.A., 2016. Effects of sodium nitroprusside (SNP) pretreatment on UV-B stress tolerance in lettuce (*Lactuca sativa* L.) seedlings. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23(1), 589-597. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5301-1>
- Fahrig, L., 2003. Effects of habitat fragmentation on biodiversity. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 34(1), 487-515. <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.34.011802.132419>
- Favaretto, V.F., Martinez, C.A., Soriani, H.H., Furriel, R.P., 2011. Differential responses of antioxidant enzymes in pioneer and late-successional tropical tree species grown under sun and shade conditions. *Environ. Exp. Bot.* 70(1), 20-28. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2010.06.003>
- Federici, G., Shaw, B.J, Handy, R.D., 2007. Toxicity of titanium dioxide nanoparticles to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): gill injury, oxidative stress, and other physiological effects. *Aquat Toxicol.* 84, 415-430. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2007.07.009>
- Freschi, L., 2013. Nitric oxide and phytohormone interactions, current status and perspectives. *Front. Plant Sci.* 4, 398. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00398>
- Gama, V.N., 2013. Análises morfofisiológicas de plantas de pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam.) cultivadas em pleno sol e em sombreamento natural (Master's thesis, Universidade Federal do Espírito Santo). <http://repositorio.ufes.br/handle/10/10004>
- Giannopolitis, C.N., Ries, S.K., 1977. Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiol.*, 59(2), 309-314. <https://doi.org/10.1104/pp.59.2.309>
- Givnish, T.J., 1988. Adaptation to sun and shade a whole-plant perspectives, ecology of photosynthesis in sun and shade. *Aust. J. Plant Physiol.* 15, 63-92. <https://doi.org/10.1071/PP9880063>
- Gratzer, G., Darabant, A., Chhetri, P.B., Rai, P.B., Eckmüllner, O., 2004. Interspecific variation in the response of growth, crown morphology, and survivorship to light of six tree species in the conifer belt of the Bhutan Himalayas. *Can. J. For. Res.* 34(5), 1093-1107. <https://doi.org/10.1139/x03-281>
- Griscom, H.P., Ashton, P.M.S., Berlyn, G.P., 2005. Seedling survival and growth of native tree species in pastures, implications for dry tropical forest rehabilitation in central Panama. *For. Ecol. Manag.* 218(1-3), 306-318. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2005.08.026>
- Guo, X.R., Cao, K.F., Xu, Z.F., 2006. Acclimation to irradiance in seedlings of three tropical rain forest *Garcinia* species after simulated gap formation. *Photosynthetica*, 44(2), 193-201. <https://doi.org/10.1007/s11099-006-0006-9>
- Harvey, H.P., Van Den Driessche, R., 1997. Nutrition, xylem cavitation and drought resistance in hybrid poplar. *Tree Physiol.* 17(10), 647-654. <https://doi.org/10.1093/treephys/17.10.647>

- Ishida, A., Nakano, T., Matsumoto, Y., Sakoda, M., Ang, L.H., 1999. Diurnal changes in leaf gas exchange and chlorophyll fluorescence in tropical tree species with contrasting light requirements. *Ecol. Res.* 14(2), 77-88. <https://doi.org/10.1046/j.1440-1703.1999.00291.x>
- Jacobs, D.F. Salifu, K.F., Seifert, J.R., 2005. Relative contribution of initial root and shoot morphology in predicting field performance of hardwood seedlings. *New Forests.* 30(2-3), 235-251. <https://doi.org/10.1007/s11056-005-5419-y>
- Johnson, P.S., Shifley, S.R., Rogers, R., 2009. *The ecology and silviculture of oaks.* CABI.
- Kamaluddin, M., Grace, J., 1993. Growth and photosynthesis of tropical forest tree seedlings (*Bischofia javanica* Blume) as influenced by a change in light availability. *Tree Physiol.*, 13, 189-201. <https://doi.org/10.1093/treephys/13.2.189>
- Kitajima, K., 1994. Relative importance of photosynthetic traits and allocation patterns as correlates of seedling shade tolerance of 13 tropical trees. *Oecologia*, 98(3-4), 419-428. <https://doi.org/10.1007/BF00324232>
- Kitao M., Yoneda R., Tobita H., Matsumoto Y., Maruyama Y., Arifin A., Azani A.M., Muhamad M.N., 2006 Susceptibility to photoinhibition in seedlings of six tropical fruit tree species native to Malaysia following transplantation to a degraded land. *Trees*, 20, 601–610. <https://doi.org/10.1007/s00468-006-0075-1>
- Krause, G.H., Koroleva, O.Y., Dalling, J.W., Winter, K., 2001. Acclimation of tropical tree seedlings to excessive light in simulated tree-fall gaps. *Plant Cell Environ.* 24(12), 1345-1352. <https://doi.org/10.1046/j.0016-8025.2001.00786.x>
- Krause, G.H., Winter, K., Matsubara, S., Krause, B., Jahns, P., Virgo, A., Aranda, J., García, M., 2012. Photosynthesis, photoprotection, and growth of shade-tolerant tropical tree seedlings under full sunlight. *Photosynth. Res.* 113(1-3), 273-285. <https://doi.org/10.1007/s11120-012-9731-z>
- Kretzschmar, F.D.S., 2007. Influência de atmosfera enriquecida em CO₂, do radical óxido nítrico e de eliciadores fungicos na produção de fitoalexinas em plântulas de soja. (Master's thesis, Universidade Estadual de Campinas). <http://repositorio.unicamp.br/jspui/handle/REPOSIP/317714>
- Kursar T.A., Coley P.D., 1999. Contrasting modes of light acclimation in two species of the rainforest understory. *Oecologia.* 121, 489–498. <https://doi.org/10.1007/s004420050955>
- Laisk, A., Eichelmann, H., Oja, V., Rasulov, B., Padu, E., Bichele, I., Pettai, H., Kull, O., 2005. Adjustment of leaf photosynthesis to shade in a natural canopy: rate parameters. *Plant Cell Environ.* 28:375-388. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2004.01274.x>
- Lamb, D. 2001. Reforestation. *Encyclopedia of Biodiversity.* Elsevier, 97-108. <https://doi.org/10.1016/B0-12-226865-2/00230-3>

Landi, M., Tattini, M., Gould, K.S., 2015. Multiple functional roles of anthocyanins in plant environment interactions. *Environ. Exp. Bot.* 119, 4–17. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2015.05.012>

Lawlor, D.W., 2002. Carbon and nitrogen assimilation in relation to yield: mechanisms are the key to understanding production systems. *J. Exp. Bot.* 53(370), 773-787. <https://doi.org/10.1093/jexbot/53.370.773>

Lee, Y., Howard, L.R., Villalón, B., 1995. Flavonoids and antioxidant activity of fresh pepper (*Capsicum annuum*) cultivars. *J. Sci. Food Agric.* 60, 473-476. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1995.tb09806.x>

Lorenzi, H., 2002. Árvores brasileiras, Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil. 2ª ed. Nova Odessa, Instituto Plantarum, 368p.

Magalhães, N.S., Marengo, R.A., Mendes, K.R., 2009. Aclimação de mudas de acariquara à alta irradiância. *Pesqui. Agropecu. Bras.* 44, 687-694. <https://doi.org/10.1590/s0100-204x2009000700006>

Martinazzo, E.G., Anese, S., Wandscheer, A.C.D., Pastorini, H., 2007. Efeito do sombreamento sobre o crescimento inicial e teor de clorofila foliar de *Eugenia uniflora* Linn (pitanga) – família Myrtaceae. *R. Bras. Bioci.* 5(2), 162-164.

Matos, F.S., Moreira, C.V., Missio, R.F., Dias, L.A.S., 2009. Caracterização fisiológica de mudas de *Jatropha curcas* L. produzidas em diferentes níveis de irradiância. *Rev. Colomb. Cienc. Hortic.* 3(1), 126-134. <https://doi.org/10.17584/rcch.2009v3i1.1204>

Maule, H.G., Andrews, M., Morton, J.D., Jones, A.V., Daly, G.T., 1995. Sun/shade acclimation and nitrogen nutrition of *Tradescantia fluminensis*, a problem weed in New Zealand native forest remnants. *New Zeal. J. Ecol.* 19(1), 35-46. <https://www.jstor.org/stable/24053668>

Mazzanatti, T., Calzavara, A.K., Pimenta, J.A., Oliveira, H.C., Stolf-Moreira, R., Bianchini, E., 2016. Light acclimation in nursery, morphoanatomy and ecophysiology of seedlings of three light-demanding neotropical tree species. *Braz. J. Bot.* 39(1), 19-28. <https://doi.org/10.1007/s40415-015-0203-5>

Mendoza-Bautista, C., Garcia-Moreno, F., Rodríguez-Trejo, D.A., Castro-Zavala, S., 2011. Solar radiation and seedling quality in a vara de perilla (*Symphoricarpos microphyllus* H. B. K.) plantation. *Agrociencia.* 45(2), 235-243. http://scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-31952011000200008&lng=es&nrm=iso.

Mittler, R., 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* 7(9), 405-410. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(02\)02312-9](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(02)02312-9)

Moraes, G.A.B.K., Chaves, A.R.M., Martins, S.C.V., Barros, R.S., DaMatta, F.M., 2010. Why is it better to produce coffee seedlings in full sunlight than in the shade? A morphophysiological approach. *Photosynthetica*, 48(2), 199-207. <https://doi.org/10.1007/s11099-010-0025-4>

- Murchie, E.H., Horton, P., 1997. Acclimation of photosynthesis to irradiance and spectral quality in British plant species, chlorophyll content, photosynthetic capacity and habitat preference. *Plant Cell Environ.* 20(4), 438-448. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.1997.d01-95.x>
- Nakano, Y., Asada, K., 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* 22(5), 867-880. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a076232>
- Oguchi, R., Hikosaka, K., Hirose, T., 2005. Leaf anatomy as a constraint for photosynthetic acclimation: differential responses in leaf anatomy to increasing growth irradiance among three deciduous trees. *Plant Cell Environ.* 28(7), 916-927. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2005.01344.x>
- Pacheco, F.V., Pereira, C.R., Silva, R.L.D., Alvarenga, I.C.A., 2013. Initial growing of *Dalbergia nigra* (Vell.) Allemão ex. Benth (Fabaceae) and *Chorisia speciosa* A. St.-Hil (Malvaceae) at different levels of shade. *Rev. Árvore*, 37(5), 945-953. <http://doi.org/10.1590/S0100-67622013000500017>
- Peixoto, P.H.P., Cambraia, J., Sant'Anna, R., Mosquim, P.R., Moreira, M.A., 1999. Aluminum effects on lipid peroxidation and on the activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. *Braz. J. Plant Physiol.* 11(3), 137-143.
- Peltzer, D., Polle, A., 2001. Diurnal fluctuations of antioxidative systems in leaves of field-grown beech trees (*Fagus sylvatica*): responses to light and temperature. *Physiol. Plantarum.* 111(2), 158-164. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2001.1110205.x>
- Pollastri, S., Tattini, M., 2011. Flavonols: old compounds for old roles. *Ann. Bot.* 108, 1225–1233. <https://doi.org/10.1093/aob/mcr234>
- Poorter, L., 1999. Growth responses of 15 rain-forest tree species to a light gradient: the relative importance of morphological and physiological traits. *Funct. Ecol.* 13(3), 396-410. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2435.1999.00332.x>
- Poorter, H., Nagel, O. 2000. The role of biomass allocation in the growth response of plants to different levels of light, CO₂, nutrients and water: a quantitative review. *Aust. J. Plant Physiol.* 27(12), 1191-1191. https://doi.org/10.1071/PP99173_CO
- Portsmuth, A., Niinemets, Ü., 2007. Structural and physiological plasticity in response to light and nutrients in five temperate deciduous woody species of contrasting shade tolerance. *Funct. Ecol.* 21(1), 61-77. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2006.01208.x>
- Quan, L.J., Zhang, B., Shi, W.W., Li, H.Y., 2008. Hydrogen peroxide in plants: a versatile molecule of the reactive oxygen species network. *J. Integr. Plant Biol.* 50(1), 2-18. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2007.00599.x>
- R CoreTeam, 2018. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Disponível em: <<https://www.r-project.org/>>.

- Romero-Puertas, M.C., Laxa, M., Mattè, A., Zaninotto, F., Finkemeier, I., Jones, A.M.E., Perazolli, M., Vandelle, E., Dietz, K.J., Delledonne, M., 2007. S-nitrosylation of peroxiredoxin II E promotes peroxynitrite-mediated tyrosine nitration. *Plant Cell*. 19, 4120–4130. <https://doi.org/10.1105/tpc.107.055061>
- Rossatto, D.R., Kolb, R.M., 2010. *Gochnatia polymorpha* (Less.) Cabrera (Asteraceae) changes in leaf structure due to differences in light and edaphic conditions. *Acta Bot. Bras.* 24(3), 605-612. <http://doi.org/10.1590/S0102-33062010000300002>
- Rozendaal, D.M.A., Hurtado, V.H., Poorter, L., 2006. Plasticity in leaf traits of 38 tropical tree species in response to light; relationships with light demand and adult stature. *Funct. Ecol.* 20(2), 207-216. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2006.01105.x>
- Sabbi, L.D.B.C., Ângelo, A.C., Boeger, M.R., 2010. Influência da luminosidade nos aspectos morfoanatômicos e fisiológicos de folhas de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) implantadas em duas áreas com diferentes graus de sucessão, nas margens do Reservatório Iraí, Paraná, Brasil. *Iheringia, Série Botânica*, 65(2), 171-181.
- Salifu, K.F., Timmer, V.R. 2001. Nutrient retranslocation response of *Picea mariana* seedlings to nitrogen supply. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 65(3), 905-913. <https://doi.org/10.2136/sssaj2001.653905x>
- Santa-Cruz, D., Pacienza, N., Zilli, C., Tomaro, M., Balestrasse, K., Yannarelli, G., 2014. Nitric oxide induces specific isoforms of antioxidant enzymes in soybean leaves subjected to enhanced ultraviolet-B radiation. *J. Photochem. Photobiol. B.* 141, 202–209. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2014.09.019>
- Santos, M.C., Seabra, A.B., Pelegrino, M.T., Haddad, P.S., 2016. Synthesis, characterization and cytotoxicity of glutathione- and PEG-glutathione-superparamagnetic iron oxide nanoparticles for nitric oxide delivery. *Appl. Surf. Sci.* 367, 26-35. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2016.01.039>
- Sanz, L., Albertos, P., Mateos, I., Sánchez-Vicente, I., Lechón, T., Fernández-Marcos, M., Lorenzo, O., 2015. Nitric oxide (NO) and phytohormones crosstalk during early plant development. *J. Exp. Bot.* 66(10), 2857-2868. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv213>
- Scalon, S.P.Q., Mussury, R.M., Rigoni, M.R., Filho, H.S., 2003. Crescimento inicial de mudas de *Bombacopsis glabra* (Pasq.) A. Robyns sob condição de sombreamento. *Rev. Árvore*, 27(6), 753-758. <https://doi.org/10.1590/s0100-67622003000600001>
- Sessa, E.B., Givnish, T.J., 2014. Leaf form and photosynthetic physiology of *Dryopteris* species distributed along light gradients in eastern North America. *Funct. Ecol.* 28(1), 108-123. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.12150>
- Shi, S., Wang, G., Wang, Y., Zhang, L., Zhang, L., 2005. Protective effect of nitric oxide against oxidative stress under ultraviolet-B radiation. *Nitric Oxide*, 13, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2005.04.006>

- Shimizu, M., Ishida, A., Tange, T., Yagi, H., 2006. Leaf turnover and growth responses of shade-grown saplings of four *Shorea* rain forest species to a sudden increase in light. *Tree Physiol.* 26(4), 449-457. <https://doi.org/10.1093/treephys/26.4.449>
- Siegert, C. M., Levia, D.F., 2011. Stomatal conductance and transpiration of co-occurring seedlings with varying shade tolerance. *Trees*, 25(6), 1091-1102. <https://doi.org/10.1007/s00468-011-0584-4>
- Silva, A.S., Oliveira, J.G., Cunha, M., Vitória, A.P., 2010. Photosynthetic performance and anatomical adaptations in *Byrsonima sericea* DC. under contrasting light conditions in a remnant of the Atlantic Forest. *Braz. J. Plant Physiol.* 22(4), 245-254. <http://doi.org/10.1590/S1677-04202010000400004>
- Sims, D. A., Pearcy, R.W., 1992. Response of leaf anatomy and photosynthetic capacity in *Alocasia macrorrhiza* (Araceae) to a transfer from low to high light. *Am. J. Bot.*, 79(4), 449-455. <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1992.tb14573.x>
- Song, L., Ding, W., Zhao, M., Sun, B., Zhang, L., 2006. Nitric oxide protects against oxidative stress under heat stress in the calluses from two ecotypes of reed. *Plant Sci.* 171, 449–458. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2006.05.002>
- Souza, R.P., Válio, I.F., 2003. Seedling growth of fifteen Brazilian tropical tree species differing in successional status. *Braz. J. Bot.* 26(1), 35-47. <http://doi.org/10.1590/S0100-84042003000100005>
- Strauss-Debenedetti, S., Berlyn, G.P. 1994. Leaf anatomical responses to light in five tropical Moraceae of different successional status. *Am. J. Bot.* 81(12), 1582-1591. <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1994.tb11470.x>
- Swain, T., Hillis, W.E., 1959. The phenolic constituents of *Prunus domestica*. I.—The quantitative analysis of phenolic constituents. *J. Sci. Food Agric.* 10(1), 63-68. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740100110>
- Swaine, M.D., Whitmore, T.C., 1988. On the definition of ecological species groups in tropical rain forests. *Vegetatio*, 75(1-2), 81-86. <https://doi.org/10.1007/BF00044629>
- Tatagiba, S.D., Pezzopane, J.E.M., Dos Reis, E.F., Dardengo, M.C.J.D., Effgen, T.A.M., 2007. Comportamento fisiológico de dois clones de *Eucalyptus* na época seca e chuvosa. *Cerne*, 13(2), 149-159. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=74413204>
- Treutter, D., 2006. Significance of flavonoids in plant resistance: a review. *Environ. Chem. Lett.* 4, 147–157. <https://doi.org/10.1007/s10311-006-0068-8>
- Valladares, F., Wright, S.J., Lasso, E., Kitajima, K., Pearcy, R.W., 2000. Plastic phenotypic response to light of 16 congeneric shrubs from a Panamanian rainforest. *Ecology*, 81(7), 1925-1936. [https://doi.org/10.1890/0012-9658\(2000\)081\[1925:PPRTL0\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/0012-9658(2000)081[1925:PPRTL0]2.0.CO;2)
- Wellburn, A.R., 1994. The spectral determination of chlorophylls *a* and *b*, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different

resolution. *J. Plant Physiol.* 144, 307-313. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)81192-2](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(11)81192-2)

Williams, N.M., 2011. Restoration of nontarget species, bee communities and pollination function in riparian forests. *Restor. Ecol.* 19, 450–459. <https://doi.org/10.1111/j.1526-100X.2010.00707.x>

Yamashita, N., Koike, N., Ishida, A., 2002. Leaf ontogenetic dependence of light acclimation in invasive and native subtropical trees of different successional status. *Plant Cell Environ.* 25(10), 1341-1356. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.2002.00907.x>

Zamith, L.R., Scarano, F.R., 2004. Produção de mudas de espécies das restingas do município do Rio de Janeiro, RJ, Brasil. *Acta Bot. Bras.* 18(1), 161-176. <https://doi.org/10.1590/s0102-33062004000100014>

Zhang, Y., Tan, J., Guo, Z., Lu, S., He, S., Shu, W., Zhou, B., 2009. Increased abscisic acid levels in transgenic tobacco over-expressing 9 *cis*-epoxycarotenoid dioxygenase influence H₂O₂ and NO production and antioxidant defenses. *Plant Cell Environ.* 32, 509–519. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2009.01945.x>

CAPÍTULO 2

Efeito do doador de óxido nítrico encapsulado em nanopartículas de quitosana sobre mudas das espécies arbóreas neotropicais *Heliocarpus popayanensis* Kunth e *Cariniana estrellensis* (Raddi) Kuntze submetidas à aclimação a pleno sol

Patrícia Juliana Lopes-Oliveira ^{a,*}; Amedea Barozzi Seabra ^b; Halley Caixeta de Oliveira ^a

^a Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Departamento de Biologia Animal e Vegetal, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina (UEL). Rodovia Celso Garcia Cid, PR 445, km 380, Campus Universitário, CEP 86057-970 Londrina, PR, Brasil.

^b Centro de Ciências Naturais e Humanas, Universidade Federal do ABC (UFABC), Av. dos Estados 5001, CEP 09210-580, Santo André, SP, Brasil.

* Autor para correspondência:

E-mail: patty_jull@hotmail.com

Artigo a ser submetido ao periódico – **Nitric Oxide**

Normas do periódico: <https://www.elsevier.com/journals/nitric-oxide/1089-8603/guide-for-authors>

RESUMO

A falta de aclimação das mudas utilizadas em reflorestamentos provoca uma grande mortalidade destas, aumentando o custo do plantio e evidenciando a necessidade da produção de mudas de melhor qualidade. Em viveiros florestais, as mudas passam pela fase de rustificação, que é importante para que respondam melhor às condições adversas que são encontradas em campo. Pesquisas demonstram a eficiência do óxido nítrico (NO) na resposta contra diversos estresses abióticos. Porém, o tratamento direto das plantas com NO é dificultado pela sua natureza gasosa e curta meia vida. As nanopartículas (NP) carreadoras de doadores de NO surgem como uma alternativa para proteger essas moléculas da decomposição, permitindo uma liberação controlada e ampliando seu período de ação. Diante disso, este trabalho teve como objetivo verificar o efeito da utilização de doador de NO, na forma livre e encapsulado em NP poliméricas de quitosana, na aclimação de mudas de duas espécies utilizadas em reflorestamentos de Floresta Estacional Semidecidual: *Heliocarpus popayanensis* Kunth e *Cariniana estrellensis* (Raddi) Kuntze mantidas sob o sol pleno no viveiro. As mudas foram cultivadas durante 6 semanas no setor de rustificação do viveiro, onde foram realizados os tratamentos: nanopartículas de quitosana contendo o S-nitroso-MSA (NP S-nitroso-MSA), S-nitroso-MSA livre (S-nitroso-MSA) e nanopartículas de quitosana com o MSA não nitrosado (NP MSA), além do Controle (sem tratamento). Utilizando-se de índices que relacionam parâmetros morfológicos, foi estimada a qualidade das mudas. Foram investigados também parâmetros fisiológicos e bioquímicos associados à resposta destas plantas à intensidade luminosa elevada. As mudas de *H. popayanensis* apresentaram aumento de área foliar, comprimento da parte aérea, diâmetro do caule e massa seca de raiz, caule e folhas. Observou-se a diminuição dos fenois. Já para *C. estrellensis* não foram observados efeitos do tratamento com S-nitroso-MSA livre ou encapsulado, indicando que a resposta da espécie não deve ser mediada pelo NO. Apesar do efeito positivo no crescimento da espécie pioneira, os mecanismos envolvidos não são claros, fazendo com que sejam necessários mais estudos acerca dos mecanismos de ação do NO em plantas neotropicais sob estresse luminoso.

Palavras-chave: Fotossíntese; Nanotecnologia; Reflorestamento; S-nitrosotiol; Viveiro

1. INTRODUÇÃO

Apesar de a luz ser o principal fator ambiental que regula o desenvolvimento do aparelho fotossintético, a exposição imediata ao sol pleno também pode limitar o crescimento e a sobrevivência das plantas [1, 2]. Isto ocorre porque o excesso de luz incidente pode provocar danos oxidativos nas folhas, associados à formação excessiva de espécies reativas de oxigênio (ERO), incluindo ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) [3, 4, 5, 6]. A acumulação de ERO provoca a peroxidação lipídica, o que pode levar à morte celular da planta [7]. Além disso, o excesso de luz pode ter efeitos como a fotoinibição, que é caracterizada pela redução da eficiência do fotossistema II, podendo provocar uma queda na assimilação de CO_2 e no crescimento [8]. A aclimação promovida durante a rustificação das mudas em viveiro visa possibilitar que as mudas respondam melhor às condições adversas encontradas em campo, incluindo a elevada intensidade luminosa, resultando em uma maior qualidade das mudas e uma diminuição no número de replantios [9, 10, 11]

Como o ambiente natural exibe um conjunto complexo de condições abióticas que causam estresse nas plantas e sua capacidade de responder a esses estresses é altamente flexível e equilibrada através da interação entre moléculas de sinalização, os hormônios vegetais possuem um papel fundamental no processo de aclimação [12, 13]. Entre as moléculas que interagem com hormônios, o óxido nítrico (NO) vem atraindo grande interesse da comunidade científica [14, 15, 16] por ser importante na resposta dos vegetais contra diversos estresses [17]. Estudos demonstraram que o tratamento de plantas com NO resulta em uma maior tolerância a vários tipos de estresses abióticos, incluindo seca, salinidade, metais pesados e temperaturas extremas [17, 18, 19]. Além disso, o NO está envolvido na via de sinalização que regula as isoformas específicas de enzimas antioxidantes que protegem contra o estresse oxidativo induzido pelo estresse luminoso [20].

Contudo, o tratamento direto das plantas com NO é um método laborioso, já que este apresenta natureza gasosa e curta meia vida *in vivo* (<6 s), fazendo com que seja necessário o suprimento constante deste aos tecidos [21]. Certos doadores de NO de baixo peso molecular, como o nitroprussiato de sódio (SNP) e os S-nitrosotióis (RSNO), vêm sendo largamente utilizados para a análise das funções biológicas do NO em plantas, visto que são capazes de prolongar e preservar as atividades biológicas do NO *in vivo*, sendo considerados bons reservatórios, transportadores e

liberadores deste radical livre [22, 23]. Dentre estes doadores de NO encontra-se o ácido *S*-nitroso-mercaptopuccínico (*S*-nitroso-MSA), que faz parte da classe dos RSNO e apresenta melhor custo-benefício quando comparados com outros doadores mais utilizados, como a GSNO, por exemplo [23].

Entretanto, os doadores de NO têm caráter instável e são suscetíveis a fatores ambientais como elevadas temperaturas e exposição à luz, o que causa uma liberação rápida e em maior quantidade do que a desejável, podendo inclusive ser tóxico para a planta, reduzindo assim os efeitos sinalizadores do NO [21]. Diante disso, a encapsulação de doadores de NO em nanomateriais surge como uma estratégia para proteger essas moléculas da decomposição, permitindo uma liberação controlada de NO, ampliando seu período de ação e viabilizando sua aplicação em condições não controladas em campo. Nesse caso, as nanopartículas (NPs) são estudadas como uma alternativa para minimizar essas limitações [21, 24]. Essa tecnologia é relativamente nova e representa uma estratégia promissora, podendo ter impactos positivos importantes sobre a fisiologia da planta, particularmente na germinação das sementes, proteção contra patógenos e no crescimento vegetal [25].

Vários nanomateriais podem ser associados ao NO para entregar diretamente esse radical livre aos sítios-alvo em plantas [25]. Um exemplo é a quitosana, que é um polímero biodegradável que não apresenta influência negativa sobre o metabolismo das plantas. Além disso, a quitosana possui propriedades mucoadesivas, o que facilita o transporte desses compostos ativos através das membranas celulares [25].

Apenas em 2016 NPs liberadoras de NO foram utilizadas pela primeira vez para proteger as plantas de um fator de estresse abiótico. Oliveira et al. [26] analisaram o efeito de NPs de quitosana carreando o ácido *S*-nitroso-mercaptopuccínico (*S*-nitroso-MSA) sobre plantas de milho submetidas ao estresse salino. Os autores observaram que as NPs mostraram-se mais eficientes do que o doador livre em promover uma liberação mais lenta e controlada do NO, resultando em proteção contra os efeitos da alta salinidade. A bioatividade melhorada do NO foi associada à liberação sustentada dessa molécula pelas NPs poliméricas [26]. Este trabalho pioneiro abriu um leque de possibilidades para o uso dessas nanoformulações.

Portanto, as NPs carreadoras de doadores de NO surgem como uma estratégia para a obtenção de plantas mais tolerantes a estresses, e conseqüentemente, para a melhoria dos programas de reflorestamento e recuperação de ambientes degradados.

Diante do exposto, este trabalho teve como objetivo verificar o efeito da utilização de doador de NO, na forma livre e encapsulado em NPs poliméricas, nas mudas de *Heliocarpus popayanensis* Kunth e *Cariniana estrellensis* (Raddi) Kuntze mantidas sob o sol pleno no viveiro para aclimação, considerando parâmetros morfológicos, bioquímicos e fisiológicos. Mudanças tratadas com NP S-nitroso-MSA apresentam características de rusticidade mais pronunciadas e que podem contribuir para maior tolerância aos estresses enfrentados após o plantio no campo?

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 LOCAL DE ESTUDO

O experimento foi realizado em viveiro florestal pertencente ao Laboratório de Biodiversidade e Restauração de Ecossistemas (LABRE), localizado no Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina (UEL), Londrina, PR, Brasil (23°19'28"S, 51°11'54"O, 602 m altitude).

2.2 ESPÉCIES E CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

Foram utilizadas duas espécies arbóreas nativas da Floresta Estacional Semidecidual e empregadas em programas de reflorestamento desenvolvidos pelo Laboratório de Biodiversidade e Restauração de Ecossistemas (LABRE) da Universidade Estadual de Londrina. Foram escolhidas espécies de grupos ecológicos distintos, sendo a espécie *Heliocarpus popayanensis* Kunth (Malvaceae), conhecida popularmente como jangadeiro, pau-jangada, algodoeiro ou jangada-brava, classificada como espécie heliófita e pioneira, sendo encontrada em sucessão inicial [27]. Já a espécie *Cariniana estrellensis* (Raddi) Kuntze (Lecythidaceae) é conhecida popularmente como jequitibá-branco, caracterizando-se como secundária tardia e semidecídua, sendo tolerante à sombra, apesar de atingir o dossel [27].

Foi adotado o método usual de produção de mudas do viveiro, que possui três etapas. Primeiramente, as sementes foram colocadas para germinação em areia e as plântulas transplantadas para tubetes de 50 mL contendo substrato a base de composto orgânico peneirado formado por substrato vegetal e areia (9:1), além de grânulos de Osmocote® (5 g.L⁻¹ substrato), um fertilizante de liberação lenta (14% de N, 14% de P₂O₅ e 14% de K₂O). As mudas foram então mantidas no setor de

crescimento, sob sombreamento parcial com auxílio de telas de propileno (“sombrite”) até atingirem cerca de 15-20 cm de altura. Finalmente, as mudas foram transferidas para o setor de rustificação, a pleno sol, para aclimação. Elas foram mantidas por 6 semanas neste setor (período usual de aclimação no viveiro). A irradiância máxima avaliada no viveiro em dias ensolarados foi de aproximadamente 710 e 1.800 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ para plantas sob condições de sombra e pleno sol, respectivamente [28].

2.3 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS

As nanopartículas de quitosana (CS NPs) contendo o ácido mercaptossuccínico (MSA), molécula precursora do doador de NO, apresentam tamanho hidrodinâmico médio, índice de polidispersão (PDI), e potencial zeta de $38,81 \pm 18,10$ nm, $0,300 \pm 0,010$, e $17,7 \pm 0,1$ mV, respectivamente. O valor do PDI indica dispersão de nanopartículas de baixa a moderada e distribuição de tamanho homogêneo. O valor positivo do potencial zeta é atribuído à presença de grupos amino na cadeia de quitosana. A eficiência de encapsulação para MSA (1000 mM) em CS NPs foi de $91,07 \pm 0,01\%$. A alta eficiência de encapsulação de MSA em NPs de CS indica o sucesso da preparação de nanopartículas [27].

2.4 PREPARO DAS FORMULAÇÕES E NANOPARTÍCULAS

As NPs de quitosana contendo o MSA foram preparadas por gelificação ionotrópica, seguindo o procedimento descrito por Cardozo et al. [29]. Resumidamente, a quitosana foi misturada e agitada primeiramente junto com o MSA e depois adicionado lentamente tripolifosfato de sódio (TPP). Obteve-se uma suspensão de NPs contendo 10 mM de MSA como concentração final. Imediatamente antes dos tratamentos, nitrito de sódio (10 mM) foi adicionado à suspensão de NPs, fazendo com que ocorresse a nitrosação dos grupos tióis do MSA e a formação do S-nitroso-MSA associado às NPs. A suspensão foi agitada e mantida por 60 minutos em baixa temperatura e protegida da luz. Para fins de comparação, também foi realizada a nitrosação de MSA livre em solução aquosa, obtendo-se o S-nitroso-MSA não-nanoencapsulado. As formulações foram diluídas para a concentração de 2 mM antes do tratamento das mudas. Também foram utilizadas NPs com o MSA não nitrosado, para verificar se os efeitos observados nas mudas não seriam resultado da quitosana. Isto se deve ao fato de a quitosana induzir diversas respostas biológicas nas plantas,

podendo inclusive melhorar as respostas da defesa aos estresses abióticos e bióticos [30].

2.5 TRATAMENTO DAS PLANTAS COM AS NANOFORMULAÇÕES

Os tratamentos realizados nas mudas estão descritos na Tabela 1. O volume de 2 mL das formulações foi aplicado diretamente no substrato. O tratamento das plantas com as formulações foi efetuado durante 3 dias consecutivos no setor de crescimento (imediatamente antes da transferência para o setor de aclimatação), seguido por 7 dias consecutivos no início do estresse luminoso. Os tratamentos foram repetidos durante 7 dias consecutivos na semana anterior à desmontagem do experimento.

Tabela 1 - Tratamentos realizados nas mudas de *Heliocarpus popayanensis* e *Cariniana estrellensis* mantidas sob o sol pleno no viveiro para aclimatação.

Tratamento	Descrição
Controle	Sem nenhum tipo de tratamento
NP S-nitroso-MSA	Nanopartículas de quitosana contendo o doador S-nitroso-MSA
S-nitroso-MSA	Doador S-nitroso-MSA livre (não nanoencapsulado)
NP MSA	Nanopartículas de quitosana com o MSA não nitrosado

2.6 AVALIAÇÕES MORFOLÓGICAS

Ao final do experimento, foram analisadas variáveis morfológicas de 12 mudas. O diâmetro do caule foi medido na altura da borda do tubete e a espessura de folha foi medida no limbo foliar da folha mais nova completamente expandida, evitando as nervuras. Em ambos os casos, utilizou-se um paquímetro digital. O comprimento do caule e raízes foi medido com o auxílio de régua milimetrada e a área foliar total (AF), com um integrador de área foliar portátil modelo LI-3000CAP (LiCor Inc., Lincoln, NE, EUA). Para a determinação das massas secas foliar (MSF), caulinar (MSC) e radicial (MSR), os diferentes órgãos das mudas foram separados e acondicionados em sacos de papel, sendo então secos em estufa à 60°C até atingirem peso constante. Após a coleta dos dados morfológicos, foram calculadas as massas secas de parte aérea (MSPA=MSF+MSC) e total (MST=MSPA+MSR) e a área foliar específica

($AFE=AF/MSF$). Também foram calculados índices relacionados à qualidade de mudas, como a razão parte aérea/raiz ($RPAR=MSPA/MSR$), razão altura/diâmetro (RAD) e o índice de qualidade de Dickson ($IQD=MST/(RAD+RPAR)$), segundo Dickson et al. [31].

2.7 AVALIAÇÕES FISIOLÓGICAS

As variáveis fisiológicas de 10 mudas foram analisadas na semana precedente à desmontagem do experimento, utilizando-se a folha mais nova completamente expandida. As análises de trocas gasosas foram realizadas no início da manhã de dias ensolarados (para determinação da assimilação fotossintética máxima), utilizando um analisador portátil de gás infravermelho (Irga) modelo LICOR 6400 XT (LiCor Inc., Lincoln, NE, EUA) conectado a uma câmara de 6 cm² com fonte de luz de LED ajustada para DFFF de 1.900 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, suficiente para saturar a fotossíntese das mudas das duas espécies.

2.8 AVALIAÇÕES BIOQUÍMICAS

Para as análises bioquímicas, durante a desmontagem do experimento foram coletadas as folhas mais novas completamente expandidas de 5 mudas diferentes das demais análises. Os protocolos foram todos padronizados para cada espécie vegetal estudada.

Parâmetros que indicam a ocorrência de estresse oxidativo foram mensurados no mesmo dia da coleta das folhas através da dosagem de H₂O₂, seguindo a metodologia de Alexieva et al. [32], e peroxidação lipídica, seguindo a metodologia descrita por Federici et al. [33].

Também foram determinadas as atividades de enzimas antioxidantes das folhas. Para isso, 100 mg de folha foram coletadas e maceradas em N₂ líquido e adicionado o tampão fosfato de potássio para extração (100 mM; pH 7,5) contendo EDTA 1 mM e PVPP 2%. O extrato obtido foi centrifugado a 15644 xg a 4°C por 15 minutos e feitas alíquotas de 100 μL , que foram congeladas em freezer -80°C. A atividade da enzima Superóxido Dismutase (SOD) foi avaliada conforme metodologia de Giannopolitis; Ries [34], com modificações. Para a avaliação da atividade da enzima Ascorbato peroxidase (APX), foi utilizada a metodologia descrita por Nakano;

Asada [35], com modificações. Já a atividade das enzimas Peroxidases (POD) foi avaliada conforme metodologia de Peixoto et al. [36], com modificações. Os extratos obtidos para análise da atividade das enzimas antioxidantes também foram utilizados para determinar o conteúdo de proteínas totais com o reagente Coomassie Brilliant Blue G-250 da Bio-Rad, seguindo as especificações do fabricante.

Para a extração dos pigmentos fotossintéticos, as folhas foram colocadas em uma solução de acetona 80% diluída em tampão fosfato de sódio 2,5 mM (pH 7,8) e mantidas durante 15 dias em geladeira (5 °C), protegidos da luz. Os teores de carotenóides e de clorofilas *a* e *b* foram determinados através da análise das absorvâncias em 470, 646,8 e 663,2 nm e as concentrações dos pigmentos calculadas por meio das equações propostas por Wellburn [37].

Foram quantificados também os compostos fenólicos totais e flavonoides totais, seguindo as metodologias de Swain; Hillis [38] e Lee et al. [39], respectivamente, com modificações.

Em todas as análises espectrofotométricas, a leitura das absorvâncias foi realizada utilizando-se um espectrofotômetro GENESYS 10S UV-Vis (Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts - USA).

Para a análise do conteúdo de *S*-nitrosotióis (RSNOs) e nitrito (NO_2^-), visando avaliar a disponibilidade potencial de NO das folhas, utilizou-se a técnica amperométrica [40].

2.9 CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO DO *S*-NITROSO-MSA

Foi realizada também a cinética de degradação do *S*-nitroso-MSA livre e encapsulado em nanopartículas de quitosana. As formulações foram preparadas em concentração de 10 mM e diluídas para 2 mM, conforme descrito anteriormente. Em seguida, estas foram expostas à luz solar direta durante 90 minutos, sendo acompanhada a degradação do doador de NO a cada 15 minutos a 336 nm. A intensidade luminosa foi acompanhada por um luxímetro digital e o controle da temperatura da solução de *S*-nitroso-MSA foi feito com um peltier Agilent 89090A, que controla a temperatura no porta-amostra.

2.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os delineamento experimental foi totalmente casualizado. Para a avaliação das

mudas, 12 repetições foram utilizadas para as análises morfológicas, 10 para as fisiológicas e 5 para as bioquímicas (com exceção da análise do conteúdo RSNO e NO_2^- , em que foram utilizadas 6 repetições). Os dados quantitativos foram verificados quanto à normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk, homocedasticidade pelo teste de Bartlett e submetidos à análise de variância (ANOVA) e, quando significativas, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Quando não atingidas as premissas, os dados foram transformados pela função box-cox. Todas as análises foram feitas no programa R, versão 3.5.1.

3. RESULTADOS

O tratamento com as NP S-nitroso-MSA induziu uma melhora no crescimento e na qualidade das mudas de *H. popayanensis* quando comparadas com o Controle (Tabela 2). A aplicação das NP S-nitroso-MSA promoveu o aumento de parâmetros morfológicos, incluindo a área foliar, com um aumento de 31,4% em relação ao Controle; o comprimento de parte aérea (23,5%); diâmetro do caule (8,6%); massa seca do caule (25,8%); raiz (16%) e folhas (28,6%).

Diferentemente, os tratamentos com S-nitroso-MSA livre e NP MSA não tiveram efeitos positivos sobre o crescimento de *H. popayanensis*. Pelo contrário, alguns parâmetros foram reduzidos em relação ao Controle, principalmente pelo tratamento com NP MSA. Por exemplo, o diâmetro do caule e o IQD apresentaram quedas de 13,7 e 26,7%, respectivamente, em NP MSA relativas ao Controle. Para o acúmulo de biomassa nos diferentes órgãos das plantas, também houve redução tanto para o tratamento NP MSA quanto para S-nitroso-MSA em relação ao Controle. Para NP MSA, a redução da massa seca do raiz, caule e folha foi de 20%, 32,3% e 28,6%, respectivamente, enquanto para S-nitroso-MSA a redução foi de 4%, 12,9% e 19,1% para os mesmos parâmetros.

Para a espécie *C. estrellensis*, nenhum tratamento promoveu efeitos (positivos ou negativos) nos parâmetros morfológicos avaliados em relação ao Controle (Tabela 2).

Tabela 2 - Média \pm erro padrão (n=12) de variáveis morfológicas de mudas de *Heliocarpus popayanensis* (Hp) e *Cariniana estrellensis* (Ce) cultivadas no setor de rustificação do viveiro e submetidas aos seguintes tratamentos: Controle = Sem tratamento; NP S-nitroso-MSA = nanopartícula contendo o doador de NO; S-nitroso-MSA = doador de NO na forma livre; e NP MSA = nanopartícula contendo MSA não-nitrosado. AFE= área foliar específica; IQD= índice de qualidade de Dickson. RAD= razão altura/diâmetro; RPAR, razão massa seca parte aérea/raiz. Médias seguidas da mesma letra na linha não diferem entre si pela ANOVA, seguida do teste de Tukey ($p < 0,05$).

Variável	Espécie	Tratamento			
		Controle	NP S-nitroso-MSA	S-nitroso-MSA	NP MSA
Área foliar (cm ²)	Hp	43,54 \pm 1,78 ^b	57,20 \pm 3,54 ^a	38,01 \pm 2,38 ^b	34,93 \pm 1,71 ^b
	Ce	145,12 \pm 9,05 ^a	130,50 \pm 8,34 ^a	121,35 \pm 7,05 ^a	129,41 \pm 8,69 ^a
Comp. parte aérea (cm)	Hp	13,36 \pm 0,56 ^b	16,5 \pm 0,58 ^a	12,4 \pm 0,53 ^b	11,46 \pm 0,34 ^b
	Ce	14,07 \pm 0,69 ^a	13,42 \pm 0,36 ^a	13,84 \pm 0,55 ^a	14,59 \pm 0,62 ^a
Diâmetro do caule (mm)	Hp	4,08 \pm 0,09 ^b	4,43 \pm 0,10 ^a	4,01 \pm 0,09 ^b	3,52 \pm 0,06 ^c
	Ce	4,14 \pm 0,11 ^a	3,80 \pm 0,07 ^a	3,80 \pm 0,09 ^a	4,14 \pm 0,17 ^a
Espessura da folha (mm)	Hp	0,18 \pm 0,002 ^a	0,15 \pm 0,002 ^b	0,15 \pm 0,004 ^b	0,14 \pm 0,002 ^b
	Ce	0,12 \pm 0,003 ^a	0,12 \pm 0,004 ^a	0,11 \pm 0,002 ^a	0,12 \pm 0,003 ^a
Massa seca folha (g)	Hp	0,21 \pm 0,005 ^b	0,27 \pm 0,01 ^a	0,17 \pm 0,01 ^c	0,15 \pm 0,007 ^c
	Ce	0,63 \pm 0,05 ^a	0,53 \pm 0,03 ^a	0,53 \pm 0,03 ^a	0,55 \pm 0,04 ^a
Massa seca caule (g)	Hp	0,31 \pm 0,02 ^b	0,39 \pm 0,02 ^a	0,27 \pm 0,02 ^{bc}	0,21 \pm 0,01 ^c
	Ce	0,43 \pm 0,03 ^{ab}	0,33 \pm 0,02 ^b	0,37 \pm 0,02 ^{ab}	0,45 \pm 0,04 ^a
Massa seca raiz (g)	Hp	0,25 \pm 0,01 ^{ab}	0,29 \pm 0,01 ^a	0,24 \pm 0,01 ^{bc}	0,20 \pm 0,01 ^c
	Ce	0,40 \pm 0,04 ^a	0,28 \pm 0,03 ^a	0,36 \pm 0,04 ^a	0,41 \pm 0,06 ^a
Massa seca total (g)	Hp	1,11 \pm 0,02 ^a	1,20 \pm 0,02 ^a	1,08 \pm 0,03 ^a	1,02 \pm 0,01 ^a
	Ce	1,46 \pm 0,10 ^a	1,17 \pm 0,08 ^a	1,24 \pm 0,08 ^a	1,37 \pm 0,10 ^a
RPAR (g g ⁻¹)	Hp	2,08 \pm 0,16 ^{ab}	2,23 \pm 0,14 ^a	1,84 \pm 0,12 ^b	1,89 \pm 0,04 ^b
	Ce	2,62 \pm 0,14 ^a	3,13 \pm 0,11 ^a	2,64 \pm 0,11 ^a	3,02 \pm 0,13 ^a
RAD (cm mm ⁻¹)	Hp	1,93 \pm 0,16 ^a	2,05 \pm 0,14 ^a	1,89 \pm 0,12 ^a	1,92 \pm 0,04 ^a
	Ce	3,29 \pm 0,14 ^a	3,59 \pm 0,11 ^a	3,64 \pm 0,11 ^a	3,43 \pm 0,13 ^a
IQD	Hp	0,15 \pm 0,008 ^{ab}	0,17 \pm 0,01 ^a	0,13 \pm 0,005 ^{bc}	0,11 \pm 0,004 ^c
	Ce	0,24 \pm 0,02 ^a	0,18 \pm 0,02 ^a	0,21 \pm 0,02 ^a	0,25 \pm 0,03 ^a
AFE (cm ² g ⁻¹)	Hp	212,77 \pm 3,55 ^b	224 \pm 6,5 ^{ab}	230,13 \pm 5,60 ^{ab}	237,51 \pm 3,87 ^a
	Ce	229,50 \pm 6,24 ^a	240,20 \pm 3,77 ^a	228 \pm 4,85 ^a	234,24 \pm 6,59 ^a

Para a espécie *H. popayanensis*, não foi observado aumento na A das plantas tratadas com NP S-nitroso-MSA em relação ao Controle (Figura 1). Já para as mudas tratadas com S-nitroso-MSA e NP MSA, houve uma diminuição da A em relação ao Controle. Para a espécie *C. estrellensis*, os tratamentos não tiveram efeitos significativos sobre as trocas gasosas.

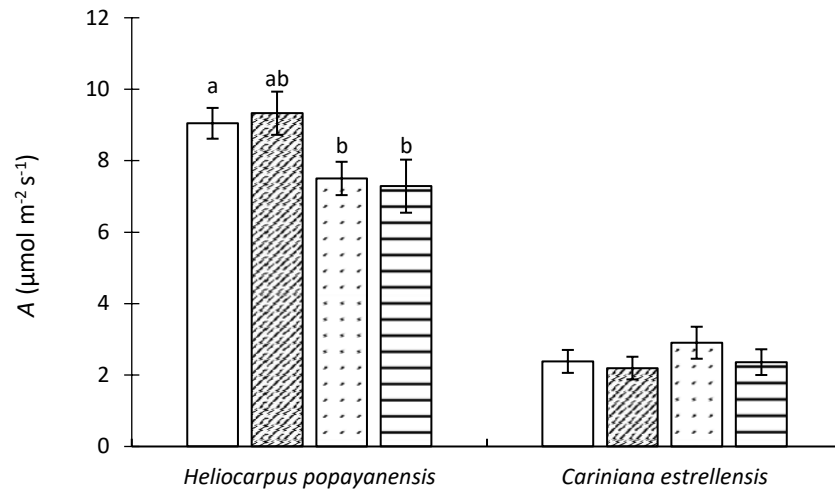


Figura 1 - Fotossíntese líquida (A) de mudas de *Heliocarpus popayanensis* e *Cariniana estrellensis* cultivadas no setor de rustificação do viveiro submetidas aos seguintes tratamentos: Controle = sem tratamento (barra branca); NP S-nitroso-MSA (barra com linhas diagonais) = nanopartícula contendo o doador de NO; S-nitroso-MSA (barra pontilhada) = doador de NO na forma livre; e NP MSA (barra tracejada) = nanopartícula de quitosana vazia. Tratamentos com letras iguais não diferem entre si pela ANOVA, seguida do teste de Tukey ($p < 0,05$). Traços sobre as barras correspondem ao erro padrão ($n=10$).

Para *H. popayanensis*, o tratamento com as NP S-nitroso-MSA induziu uma diminuição dos compostos fenólicos e aumento dos níveis de H_2O_2 nas folhas em relação ao Controle. Já em relação ao tratamento com S-nitroso-MSA, as mudas apresentaram um aumento dos níveis foliares de compostos fenólicos e dos flavonoides em relação ao Controle. Por fim, as mudas tratadas com NP MSA apresentaram diminuição dos níveis foliares de compostos fenólicos e da atividade da enzima SOD. As demais variáveis não apresentaram diferenças entre os tratamentos e o Controle (Tabela 3).

Para as mudas de *C. estrellensis* tratadas com NP S-nitroso-MSA, foi observado um aumento dos níveis de H_2O_2 nas folhas, além da diminuição da peroxidação lipídica, em relação ao Controle. Para os tratamentos com S-nitroso-MSA de NP MSA, foi observado apenas um descréscimo da peroxidação lipídica em relação ao Controle. As demais variáveis não apresentaram diferenças entre os tratamentos e o Controle (Tabela 3).

Tabela 3 - Média \pm erro padrão (n=5) de variáveis bioquímicas de mudas de *Heliocarpus popayanensis* (*Hp*) e *Cariniana estrellensis* (*Ce*) cultivadas no setor de rustificação do viveiro, e submetidas aos seguintes tratamentos: Controle = sem tratamento; NP S-nitroso-MSA = nanopartícula contendo o doador de NO; S-nitroso-MSA = doador de NO na forma livre; e NP MSA = nanopartícula de quitosana vazia. MF = Massa fresca; APX = ascorbato peroxidase; POD = peroxidases; SOD = superóxido dismutase; H₂O₂ = peróxido de hidrogênio. Médias seguidas de letras iguais na linha não diferem entre si pela ANOVA, seguida do teste de Tukey (p < 0,05).

Variável	Espécie	Tratamento			
		Controle	NP S-nitroso-MSA	S-nitroso-MSA	NP MSA
Fenóis totais (mg g ⁻¹ MF)	<i>Hp</i>	14,87 \pm 0,94 ^b	13,27 \pm 0,25 ^c	19,83 \pm 0,45 ^a	11,42 \pm 0,16 ^d
	<i>Ce</i>	59,93 \pm 4,49 ^a	65,99 \pm 2,89 ^a	62,59 \pm 4,41 ^a	49,41 \pm 3,51 ^a
Flavonoides totais (mg g ⁻¹ MF)	<i>Hp</i>	23,47 \pm 1,47 ^b	23,17 \pm 2,03 ^b	30,90 \pm 1,39 ^a	19,54 \pm 0,75 ^b
	<i>Ce</i>	46,48 \pm 2,50 ^a	52,62 \pm 1,95 ^a	49,22 \pm 2,30 ^a	47,43 \pm 4,95 ^a
APX (μ mol min ⁻¹ g ⁻¹ MF)	<i>Hp</i>	6,43 \pm 0,86 ^a	6,67 \pm 1,08 ^a	6,43 \pm 1,19 ^a	6,84 \pm 0,69 ^a
	<i>Ce</i>	3,36 \pm 0,60 ^a	3,54 \pm 0,44 ^a	3,24 \pm 0,41 ^a	3,40 \pm 0,40 ^a
POD (μ mol min ⁻¹ g ⁻¹ MF)	<i>Hp</i>	62,39 \pm 3,57 ^{ab}	71,08 \pm 3,65 ^a	68,08 \pm 2,72 ^a	51,62 \pm 2,42 ^b
	<i>Ce</i>	9,16 \pm 1,41 ^a	10,52 \pm 2,53 ^a	10,30 \pm 1,65 ^a	11,47 \pm 2,25 ^a
SOD (U g ⁻¹ MF)	<i>Hp</i>	606,02 \pm 16,61 ^a	549,89 \pm 44,65 ^a	607,49 \pm 28,66 ^a	294,53 \pm 39,83 ^b
	<i>Ce</i>	384,87 \pm 9,15 ^{ab}	410,83 \pm 9,25 ^a	346,50 \pm 6,75 ^b	397,20 \pm 12,65 ^a
Peroxidação lipídica (nmol MDA g ⁻¹ MF)	<i>Hp</i>	36,97 \pm 2,67 ^a	35,81 \pm 2,93 ^a	30,68 \pm 4,19 ^a	32 \pm 1,66 ^a
	<i>Ce</i>	58,51 \pm 1,24 ^a	42,39 \pm 2,01 ^b	22,30 \pm 3,44 ^c	38,40 \pm 1,67 ^b
H ₂ O ₂ (mg g ⁻¹ MF)	<i>Hp</i>	4,96 \pm 0,29 ^b	5,69 \pm 0,16 ^a	5,21 \pm 0,22 ^{ab}	5,13 \pm 0,14 ^b
	<i>Ce</i>	6,00 \pm 0,68 ^b	7,75 \pm 0,28 ^a	6,03 \pm 1,38 ^b	6,53 \pm 0,36 ^{ab}
Clorofilas totais (mg g ⁻¹ MF)	<i>Hp</i>	0,62 \pm 0,04 ^a	0,68 \pm 0,13 ^a	0,73 \pm 0,07 ^a	0,73 \pm 0,03 ^a
	<i>Ce</i>	2,19 \pm 0,13 ^a	2,70 \pm 0,16 ^a	2,78 \pm 0,12 ^a	3,03 \pm 0,16 ^a
Carotenoides (mg g ⁻¹ MF)	<i>Hp</i>	2,19 \pm 0,21 ^a	2,70 \pm 0,30 ^a	2,78 \pm 0,33 ^a	3,03 \pm 0,19 ^a
	<i>Ce</i>	2,71 \pm 0,35 ^a	3,95 \pm 0,32 ^a	10,26 \pm 1,48 ^a	17,94 \pm 8,80 ^a

Foi observado nas mudas de *C. estrellensis* um aumento dos níveis foliares de NO₂⁻ quando tratadas com S-nitroso-MSA (Figura 2A). Para *H. popayanensis*, o tratamento com NP MSA levou a uma diminuição do NO₂⁻ em relação ao Controle. Já em relação aos RSNO (Figura 2B), foram observados resultados significativos somente para a espécie *C. estrellensis*, que apresentou um aumento dos níveis foliares de RSNO para todos os tratamentos (NP S-nitroso-MSA; S-nitroso-MSA e NP MSA) em relação ao Controle, sendo o maior aumento observado para o tratamento NP S-nitroso-MSA.

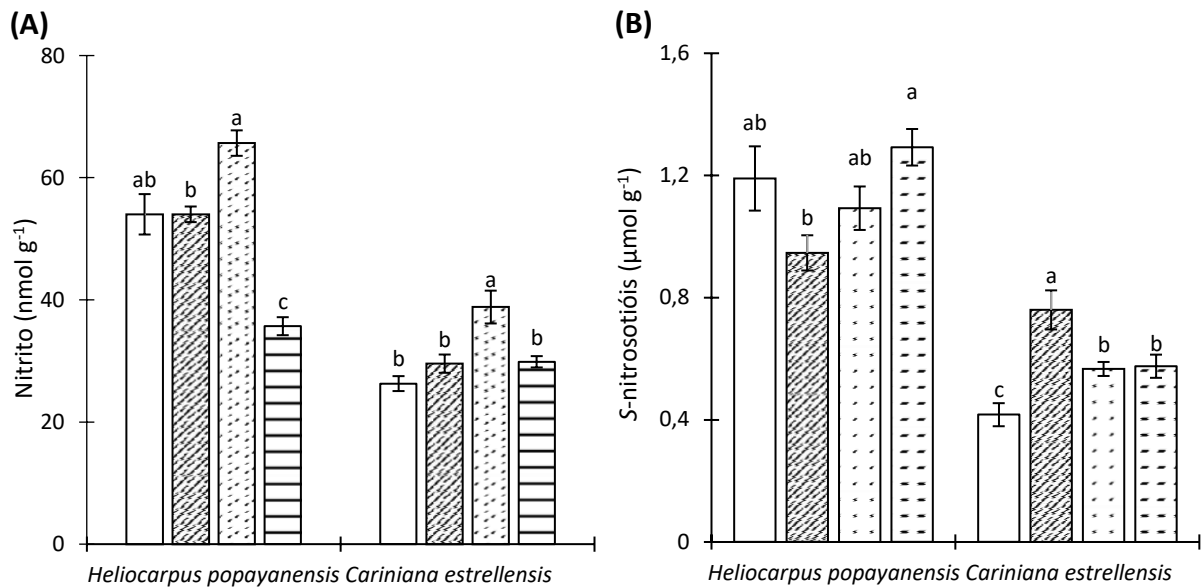


Figura 2 - (A) Níveis foliares de Nitrito; **(B)** e de S-nitrosotios ($\mu\text{mol g}^{-1}$) em mudas de *Heliocarpus popayanensis* e *Cariniana estrellensis* cultivadas no setor de rustificação do viveiro submetidas aos seguintes tratamentos: Controle = sem tratamento (barra branca); NP S-nitroso-MSA (barra com linhas diagonais) = nanopartícula contendo o doador de NO; S-nitroso-MSA (barra pontilhada) = doador de NO na forma livre; e NP MSA (barra tracejada) = nanopartícula de quitosana vazia. Tratamentos com letras iguais não diferem entre si pela ANOVA, seguida do teste de Tukey ($p < 0,05$). Traços sobre as barras correspondem ao erro padrão ($n=6$).

A Figura 3B representa a porcentagem de degradação do doador S-nitroso-MSA livre (20,78%) e encapsulado em nanopartículas de quitosana (14,31%) após 15 minutos em condições de maior intensidade luminosa e temperatura (exposto à sol pleno) (Figura 3A). Com o aumento da intensidade luminosa e temperatura, este doador é rapidamente degradado. Contudo, sua nanoencapsulação faz com que esta degradação seja um pouco mais lenta, aumentando a meia vida do doador.

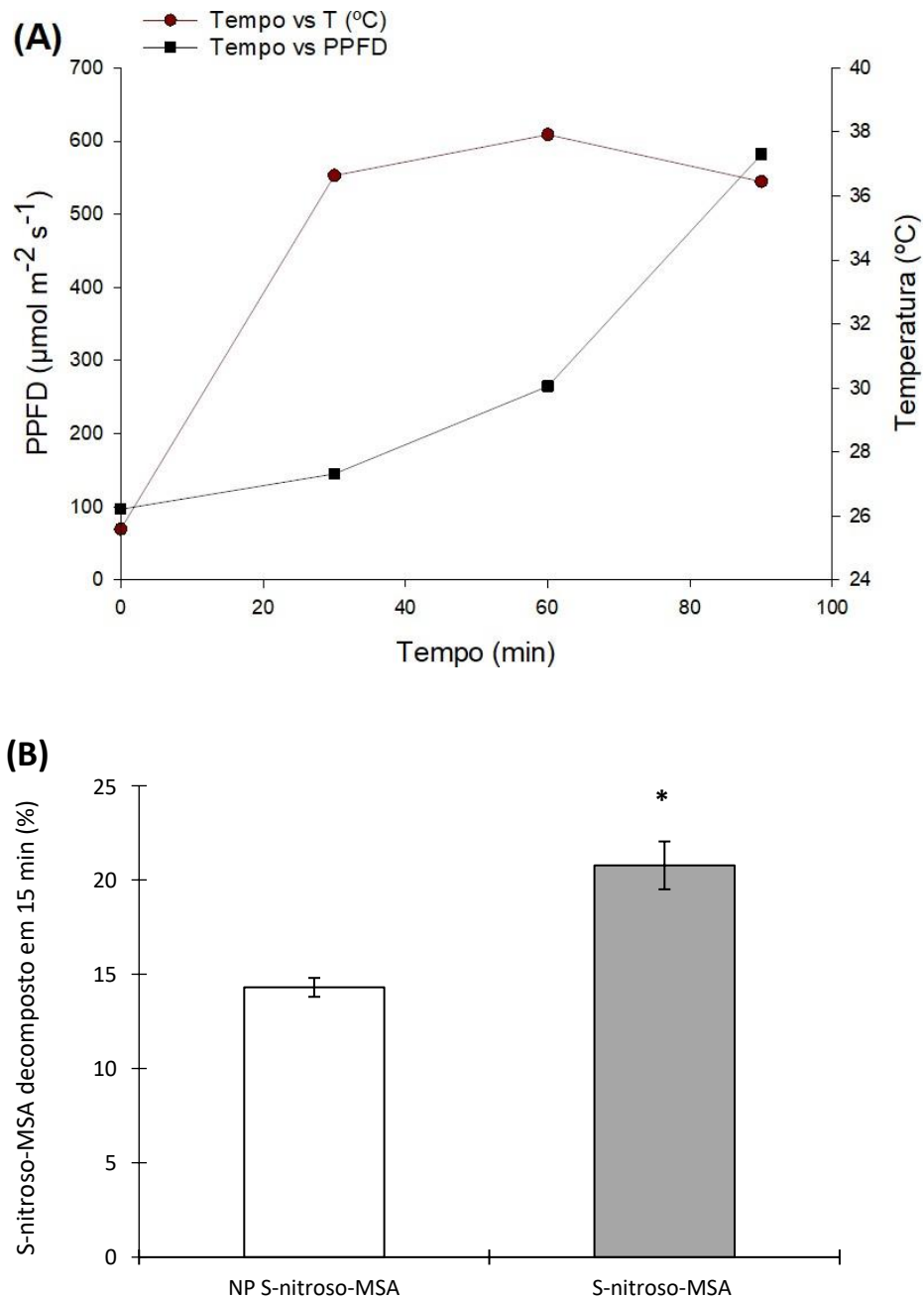


Figura 3 – (A) Intensidade luminosa e Temperatura da amostra em relação ao tempo de exposição do doador S-nitroso-MSA à luz solar; **(B)** Porcentagem de degradação do doador S-nitroso-MSA encapsulado em nanopartículas de quitosana (barra branca) e livre (barra cinza) após 15 minutos. Diferenças entre os tratamentos estão indicadas com asterisco. Traços sobre as barras correspondem ao erro padrão (n=5).

4. DISCUSSÃO

Nos últimos anos, foram feitos avanços significativos acerca do conhecimento do papel do NO na fisiologia das plantas. Muitos estudos têm focado na aplicação de doadores exógenos de NO em plantas inteiras e culturas de células *in vitro*, permitindo a obtenção de informações valiosas sobre como o NO afeta alguns processos

fisiológicos e bioquímicos [41, 42, 43, 44]. Estudos vêm mostrando como a aplicação de doadores de NO possuem efeitos protetores e aliviam o estresse abiótico como salinidade, seca, toxicidade por metal e temperaturas extremas.

A partir das respostas apresentadas pelas mudas das espécies estudadas, foi possível observar um melhor crescimento das mudas da espécie pioneira *H. popayanensis*, quando tratadas com S-nitroso-MSA nanoencapsulado. Este resultado mostra ser um efeito claro da nanoencapsulação, que protege o doador S-nitroso-MSA contra a elevada intensidade luminosa, temperatura e demais condições adversas que estão presentes no setor de rustificação dos viveiros.

Oliveira et al. [26] analisaram o efeito de nanopartículas de quitosana carreando o doador S-nitroso-MSA sobre plantas de milho submetidas ao estresse salino. Neste estudo foi observado que o doador nanoencapsulado mostrou-se mais eficiente do que o doador livre, promovendo uma liberação mais lenta e controlada do NO, resultando em proteção contra os efeitos da alta salinidade. No trabalho citado, as plantas eram cultivadas em areia, sob condições controladas em casa de vegetação. Já o presente estudo foi realizado em condições de cultivo em viveiro de mudas, evidenciando os efeitos positivos da nanoencapsulação mesmo em condições mais adversas e abrindo caminho para novas pesquisas.

Contudo, os efeitos positivos da nanoencapsulação do doador S-nitroso-MSA não foram observados para a espécie não-pioneira *C. estrellensis*, indicando que a resposta depende da espécie. Isto pode ser relacionado com os resultados obtidos no Capítulo 1, que evidenciam que somente a espécie pioneira apresenta um aumento dos níveis de NO quando submetidas à elevação da intensidade luminosa. Portanto, é possível que o NO esteja envolvido na resposta de *H. popayanensis* ao estresse luminoso, mas não de *C. estrellensis*.

Dependendo de sua concentração, o NO pode afetar o crescimento e desenvolvimento das plantas. Baixas doses do NO podem estimular o crescimento, porém doses mais altas podem ser tóxicas e prejudiciais ao desenvolvimento vegetal. No presente estudo, para a espécie pioneira *H. popayanensis*, o tratamento das plantas cultivadas no setor de aclimação sob sol pleno com NP S-nitroso-MSA induziu uma melhora de vários parâmetros morfológicos. A melhora no crescimento das mudas de *H. popayanensis* não pode ser explicada pelas análises de trocas gasosas, visto que não foi observado aumento da *A*. Contudo, foi observado o aumento da área foliar destas mudas, indicando que esse crescimento pode estar

relacionado ao aumento da fotossíntese total observado nas mudas tratadas com a nanopartícula contendo o doador de NO. Esta característica propicia o rápido crescimento das plantas quando submetidas à intensidade luminosa elevada [45]. Apesar do efeito positivo no crescimento da espécie pioneira, os mecanismos envolvidos não são claros e não estão relacionados à indução da resposta antioxidante e de pigmentos fotossintéticos. A eficácia das NP S-nitroso-MSA em mitigar os efeitos do estresse luminoso provavelmente está relacionada à liberação mais lenta do NO [21, 46]. A nanoencapsulação do doador S-nitroso-MSA pode protegê-lo da degradação por altas temperaturas e luminosidade, o que é particularmente favorecido em condições reais de campo.

O tratamento das plantas de *H. popayanensis* com o doador S-nitroso-MSA apresentou efeitos negativos em relação à fotossíntese total, espessura e massa seca foliar, além do aumento nos níveis de fenóis e flavonoides. Estes resultados podem estar relacionados ao acúmulo de NO_2^- (maior concentração de NO) observado nestas mudas, além da mudança no perfil de liberação do NO, em que uma liberação muito rápida pode ter gerado uma resposta diferente pela planta. Por fim, o tratamento com NP MSA foi ainda mais prejudicial ao crescimento e qualidade das mudas, além dos efeitos negativos na fotossíntese total e na atividade da SOD. Dificilmente estes foram resultados induzidos pela quitosana presente nas NP, visto que a quitosana demonstrou ser uma molécula natural que, dependendo de sua concentração, não inibe as plantas e induz numerosas respostas biológicas [30]. Estudos acerca do tratamento de plantas com quitosana mostram que esta estimula a taxa fotossintética, o fechamento dos estômatos através da síntese de ABA; aumenta as enzimas antioxidantes via óxido nítrico e vias de sinalização de peróxido de hidrogênio, e induz a produção de ácidos orgânicos, açúcares, aminoácidos e outros metabólitos que são necessários para o ajuste osmótico, sinalização de estresse e metabolismo energético sob estresse [47]. Estes resultados negativos podem ser um efeito do MSA reduzido, que pode alterar o equilíbrio redox.

Assim como o NO, o H_2O_2 também pode atuar como uma molécula sinalizadora e induzir mecanismos protetores e respostas de aclimação [48]. Além disso, estas moléculas podem atuar juntas em várias vias de sinalização e são possíveis fatores de indução de resistência cruzada responsáveis pelo aumento da tolerância ao estresse abiótico [49]. Como não foi observado um aumento da peroxidação lipídica, isto pode ser mais um indício de que o aumento da concentração de H_2O_2 nas mudas

de ambas as espécies tratadas com NP S-nitroso-MSA, em relação ao Controle, está relacionado à sinalização e não à geração de danos. Para a espécie *C. estrellensis* também foi observada a redução da TBARS em todos os tratamentos, podendo ser um indicativo de menos estresse oxidativo relacionado ao NO, à quitosana, ou ao MSA reduzido. Para esta espécie, os tratamentos NP S-nitroso-MSA e S-nitroso-MSA aumentaram a sinalização do NO na planta, mas sem resultar em mudanças no crescimento ou nas trocas gasosas.

Em *H. popayanensis* não foram observados níveis elevados de RSNO das plantas tratadas em relação ao Controle. Isto provavelmente ocorreu por se tratar de uma análise pontual de um processo muito dinâmico que é a homeostase NO/RSNO. A enzima S-nitrosoglutationa redutase (GSNOR) é a principal enzima para a modulação dos *pools* de RSNO em plantas [49] e catalisa a redução de S-nitrosoglutationa (GSNO), dependente de NADH, a glutationa oxidada (GSSG) e NH₃. Desta forma, é provável que a nitrosação excessiva de alvos intracelulares, causada pelos tratamentos com S-nitroso-MSA, seja prevenida pela GSNOR. Os resultados do presente estudo corroboram os de outros trabalhos, como o de Kneeshawet al. [50] que relataram um decaimento dependente de tempo do conteúdo de RSNO de plantas tratadas com o doador de NO S-nitroso-cisteína. Além deste, Ziogas et al. [51] demonstraram que a atividade de GSNOR em folhas e raízes de plantas cítricas é modulada pelo tratamento de plantas com o doador de NO nitroprussiato de sódio. Oliveira et al. [26] também demonstraram uma queda do conteúdo de RSNO nas plantas tratadas com uma maior concentração do doador S-nitroso-MSA (100 µM) (livre ou encapsulado) em comparação com a menor concentração (50 µM). Além da GSNOR, outras enzimas, como a tioredoxina, reduzem o conteúdo excessivo de RSNO nas plantas [51]. Em vista disto, ainda são necessários mais estudos sobre o equilíbrio NO/RSNO após a administração de doadores de NO.

O aumento dos níveis de RSNO nas mudas tratadas com NP S-nitroso-MSA em relação ao S-nitroso-MSA para *C. estrellensis* pode estar relacionado à liberação controlada do NO, visto que as folhas utilizadas na análise foram coletadas três dias após o último tratamento com as formulações. O teor aumentado de RSNO em folhas de plantas tratadas com NP S-nitroso-MSA indica uma liberação sustentada de NO *in vivo* pelo doador de NO encapsulado, que concorda com as taxas de liberação de NO *in vitro* [26]. Resultados semelhantes foram observados por Oliveira et al. [26], onde plantas de milho submetidas ao estresse salino tratadas com 50 µM de NP S-nitroso-

MSA apresentaram um maior conteúdo de RSNO quando comparadas ao tratamento com S-nitroso-MSA livre na mesma concentração do doador.

Um ponto importante a ser destacado é que este estudo foi desenvolvido focado em análises foliares das mudas, não sendo avaliadas as raízes das mesmas. Como os tratamentos foram realizados diretamente no substrato, há a possibilidade de que o NO tenha se acumulado nas raízes, promovendo alterações que explicariam os efeitos positivos obtidos para as mudas da espécie *H. popayanensis*.

As vias de aplicação são fatores que devem ser levados em consideração, visto que outros trabalhos mostram efeitos positivos nas plantas utilizando vias de aplicação diferentes do presente trabalho. No estudo desenvolvido por Silveira et al. [52], plantas de cana-de-açúcar submetidas à seca tiveram suas folhas tratadas com S-nitrosoglutathione (GSNO) via spray. Os resultados deste estudo mostraram que a sinalização redox mediada por NO desempenha um papel no alívio dos efeitos negativos do estresse hídrico em plantas de cana-de-açúcar, protegendo o aparato fotossintético e melhorando o crescimento de parte aérea e raízes.

5. CONCLUSÃO

A aplicação de nanopartículas carreadoras de doadores de NO surgem como uma estratégia na obtenção de plantas mais tolerantes a estresses, e conseqüentemente na melhora de programas de reflorestamento e recuperação de ambientes degradados. Os tratamentos com a NP S-nitroso-MSA promoveram o crescimento das mudas de *H. popayanensis* cultivadas no setor de rusticificação do viveiro, porém não induziu efeitos positivos ou negativos para a espécie *C. estrellensis*. Isto indica que o NO está envolvido na resposta da espécie pioneira, mas não da espécie não-pioneira. De fato, as mudas da espécie pioneira tratadas com a NP S-nitroso-MSA desenvolveram características de rusticidade mais pronunciadas, podendo contribuir para maior tolerância destas aos estresses enfrentados após o plantio no campo, contudo, os mecanismos pelos quais o NO induz a resposta destas mudas ainda não está bem elucidado, sendo necessários estudos posteriores. Este resultado abre um leque de possibilidades que podem ser exploradas para a aplicação das NP S-nitroso-MSA em plantas, visto que os efeitos positivos obtidos com a aplicação das NP contendo o doador S-nitroso-MSA, mas não com o doador livre, indicam ser um resultado da nanoencapsulação, devido à liberação mais lenta e controlada do NO.

6. PERSPECTIVAS

Estudos como o presente podem contribuir para a melhoria da tolerância e qualidade das plantas submetidas a elevada irradiância, diminuindo a taxa de mortalidade em campo, podendo aumentar o sucesso de programas de reflorestamento.

É evidente que a aplicação das NP S-nitroso-MSA provoca um efeito benéfico em plantas, entretanto, são necessários mais estudos: (1) que investiguem como é a absorção, translocação e acúmulo dessas NP em plantas; (2) que avaliem os parâmetros das raízes; (3) que testem outras espécies, buscando definir se os resultados se repetem nos grupos funcionais; (4) que investiguem se as mudas tratadas com NP contendo doadores de NO se desenvolveriam melhor em condições reais de campo; (5) que investiguem os mecanismos de interação do NO com as plantas; (6) que contribuam para o conhecimento da concentração e frequência de aplicação ótima do NO em plantas e (7) que avaliem o uso de diferentes doadores de NO e outras NPs além da quitosana.

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

7. REFERÊNCIAS

- [1] F. Valladares, J. Chico, I. Aranda, L. Balaguer, P. Dizengremel, E. Manrique, E. Dreyer. The greater seedling high-light tolerance of *Quercus robur* over *Fagus sylvatica* is linked to a greater physiological plasticity. *Trees* 16(6) (2002) 395-403. <https://doi.org/10.1007/s00468-002-0184-4>
- [2] C.H. Lusk, P.B. Reich, R.A. Montgomery, D.D. Ackerly, J. Cavender-Bares. Why are evergreen leaves so contrary about shade? *Trends Ecol. Evol.* 23(6) (2008) 299-303. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2008.02.006>
- [3] K. Asada. The water-water cycle in chloroplasts, scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50 (1999) 601-639. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.50.1.601>
- [4] R. Mittler. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* 7(9) (2002) 405-410. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(02\)02312-9](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(02)02312-9)
- [5] W.W. Adams, C.R. Zarter, V. Ebbert, B. Demmig-Adams. Photoprotective strategies of overwintering evergreens. *AIBS Bulletin* 54(1) (2004) 41-49. [https://doi.org/10.1641/0006-3568\(2004\)054\[0041:PSOOE\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1641/0006-3568(2004)054[0041:PSOOE]2.0.CO;2)
- [6] K. Asada. Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiol.* 141(2) (2006) 391-396. <https://doi.org/10.1104/pp.106.082040>
- [7] A. Esringu, O. Aksakal, D. Tabay, A.A. Kara. Effects of sodium nitroprusside (SNP) pretreatment on UV-B stress tolerance in lettuce (*Lactuca sativa* L.) seedlings. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23(1) (2016) 589-597. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5301-1>
- [8] G.H. Krause, K. Winter, S. Matsubara, B. Krause, P. Jahns, A. Virgo, J. Aranda, M. García. Photosynthesis, photoprotection, and growth of shade-tolerant tropical tree seedlings under full sunlight. *Photosynth. Res.* 113(1-3) (2012) 273-285. <https://doi.org/10.1007/s11120-012-9731-z>
- [9] X.R. Guo, K.F. Cao, Z.F. Xu. Acclimation to irradiance in seedlings of three tropical rain forest *Garcinia* species after simulated gap formation. *Photosynthetica* 44(2) (2006) 193-201. <https://doi.org/10.1007/s11099-006-0006-9>
- [10] S.D. Tatagiba, J.E.M. Pezzopane, E.F. Reis, M.C.J.D. Dardengo, T.A.M. Effgen. Comportamento fisiológico de dois clones de *Eucalyptus* na época seca e chuvosa. *Cerne* 13(2) (2007) <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=74413204>

- [11] F.S. D'avila, H.N.D. Paiva, H.G. Leite, N.F.D. Barros, F.P. Leite. Efeito do potássio na fase de rustificação de mudas clonais de eucalipto. *Rev. Árvore* 35(1) (2011). <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=48818717002>
- [12] Freschi, L., 2013. Nitric oxide and phytohormone interactions: current status and perspectives. *Front. Plant Sci.* 4, e398. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00398>
- [13] M. Asgher, T.S. Per, A. Masood, M. Fatma, L. Freschi, F.J. Corpas, N.A. Khan. Nitric oxide signaling and its crosstalk with other plant growth regulators in plant responses to abiotic stress. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 24(3) (2017) 2273-2285. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7947-8>
- [14] S.J. Neill, R. Desikan, J.T. Hancock. Nitric oxide signalling in plants. *New Phytol.* 159(1) (2003) 11-35. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2003.00804.x>
- [15] I.D. Wilson, S.J. Neill, J.T. Hancock. Nitric oxide synthesis and signalling in plants. *Plant Cell Environ.* 31(5) (2008) 622-631. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2007.01761.x>
- [16] Mur, L.A., Mandon, J., Persijn, S., Cristescu, S.M., Moshkov, I.E., Novikova, G.V., Hall, M.A., Harren, F.J.M., Hebelstrup, K.H., Gupta, K.J., 2013. Nitric oxide in plants: an assessment of the current state of knowledge. *AoB plants* 5, pls052. <https://doi.org/10.1093/aobpla/pls052>
- [17] F.S. Farnese, P.E. Menezes-Silva, G.S. Gusman, J.A. Oliveira. When bad guys become good ones: the key role of reactive oxygen species and nitric oxide in the plant responses to abiotic stress. *Front. Plant Sci.* 7 (2016) 1-15. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00471>
- [18] A.B. Seabra, H.C. Oliveira. How nitric oxide donors can protect plants in a changing environment: what we know so far and perspectives. *AIMS Molecular Science* 3(4) (2016) 692-718. <https://doi.org/10.3934/molsci.2016.4.692>
- [19] M. Simontacchi, A. Galatro, F. Ramos-Artuso, G.E. Santa-María. Plant survival in a changing environment: The role of nitric oxide in plant responses to abiotic stress. *Front. Plant Sci.* 6 (2015) 1–19. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00977>
- [20] D. Santa-Cruz, N. Pacienza, C. Zilli, M. Tomaro, K. Balestrasse, G. Yannarelli. Nitric oxide induces specific isoforms of antioxidante enzymes in soybean leaves subjected to enhanced ultraviolet-B radiation. *J. Photochem. Photobiol. B.* 141 (2014) 202–209. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2014.09.019>

- [21] A.B. Seabra, G.Z. Justo, P.S. Haddad. State of the art, challenges and perspectives in the design of nitric oxide-releasing polymeric nanomaterials for biomedical applications. *Biotechnol. Adv.* 33(6) (2015) 1370-1379. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.01.005>
- [22] A.N. Misra, R. Vladkova, R. Singh, M. Misra, A.G. Dobrikova, E.L. Apostolova. Action and target sites of nitric oxide in chloroplasts. *Nitric Oxide* 39 (2014) 35-45. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2014.04.003>
- [23] Seabra, A.B., Fabbri, G.K., Pelegrino, M.T., Silva, L.C., Rodrigues, T., 2017. Synthesis, characterization and cytotoxicity of S-nitroso-mercaptopropionic acid-containing alginate/chitosan nanoparticles. In: *Journal of Physics: Conference Series*. IOP Publishing 838(1), e012032. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/838/1/012032>
- [24] A.B. Seabra, N. Durán. Nitric oxide-releasing vehicles for biomedical applications. *J. Mater. Chem.* 20(9) (2010) 1624-1637. <https://doi.org/10.1039/B912493B>
- [25] A.B. Seabra, M. Rai, N. Durán. Nano carriers for nitric oxide delivery and its potential applications in plant physiological process: A mini review. *J. Plant Biochem. Biot.* 23 (2014) 1–10. <https://doi.org/10.1007/s13562-013-0204-z>
- [26] H.C. Oliveira, B.C.R. Gomes, M.T. Pelegrino., A.B. Seabra. Nitric oxide-releasing chitosan nanoparticles alleviate the effects of salt stress in maize plants. *Nitric Oxide* 61 (2016) 10-19. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2016.09.010>
- [27] Lorenzi, H. *Árvores brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil*. 2ª ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum. 2002.
- [28] A.K. Calzavara, J.S. Rocha, G. Lourenço, K. Sanada, C. Medri, E. Bianchini, J.A. Pimenta, R. Stolf-Moreira, H.C. Oliveira. Acclimation responses to high light by *Guazuma ulmifolia* Lam. (Malvaceae) leaves at different stages of development. *Plant Biol.* 19(5) (2017) 720-727. <https://doi.org/10.1111/plb.12592>
- [29] V.F. Cardozo, C.A.C. Lancheros, A.M. Narciso, E.C.S. Valereto, R.K.T. Kobayashi, A.B. Seabra, G. Nakazato. Evaluation of antibacterial activity of nitric oxide-releasing polymeric particles against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* from bovine mastitis. *Int. J. Pharm.* 473 (2014) 20–29. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.06.051>
- [30] Malerba, M., Cerana, R., 2016. Chitosan effects on plant systems. *Int. J. of Mol. Sci.* 17(7), e996. <https://doi.org/10.3390/ijms17070996>

- [31] A. Dickson, A.L. Leaf, J.F. Hosner. Quality appraisal of white spruce and white pine seedling stock in nurseries. *Forestry Chron.* 36(1) (1960) 10-13. <https://doi.org/10.5558/tfc36010-1>
- [32] V. Alexieva, I. Sergiev, S. Mapelli, E. Karanov. The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. *Plant Cell Environ.* 24(12) (2001) 1337-1344. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.2001.00778.x>
- [33] G. Federici, B.J. Shaw, R.D. Handy. Toxicity of titanium dioxide nanoparticles to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): gill injury, oxidative stress, and other physiological effects. *Aquat Toxicol.* 84 (2007) 415-430. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2007.07.009>
- [34] C.N. Giannopolitis, S.K. Ries. Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiol.* 59(2) (1977) 309-314. <https://doi.org/10.1104/pp.59.2.309>
- [35] Y. Nakano, K. Asada. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* 22(5) (1981) 867-880. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a076232>
- [36] P.H.P. Peixoto, J. Cambraia, R. Sant'Anna, P.R. Mosquim, M.A. Moreira. Aluminum effects on lipid peroxidation and on the activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. *Braz. J. Plant Physiol.* 11(3) (1999) 137-143.
- [37] A.R. Wellburn. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *J. Plant Physiol.* 144 (1994) 307-313. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)81192-2](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(11)81192-2)
- [38] T. Swain, W.E. Hillis. The phenolic constituents of *Prunus domestica*. I.—The quantitative analysis of phenolic constituents. *J. Sci. Food Agric.* 10(1) (1959) 63-68. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740100110>
- [39] Y. Lee, L.R. Howard, B. Villalón. Flavonoids and antioxidant activity of fresh pepper (*Capsicum annuum*) cultivars. *J. Sci. Food Agric.* 60 (1995) 473-476. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1995.tb09806.x>
- [40] M.C. Santos, A.B. Seabra, M.T. Pelegriño, P.S. Haddad. Synthesis, characterization and cytotoxicity of glutathione- and PEG-glutathione-superparamagnetic iron oxide nanoparticles for nitric oxide delivery. *Appl. Surf. Sci.* 367 (2016) 26-35. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2016.01.039>
- [41] D.A. Navarre, D. Wendehenne, J. Durner, R. Noad, D.F. Klessig. Nitric oxide modulates the activity of tobacco aconitase. *Plant Physiol.* 122(2) (2000) 573-582. <https://doi.org/10.1104/pp.122.2.573>

- [42] H. Yamasaki, H. Shimoji, Y. Ohshiro, Y. Sakihama. Inhibitory effects of nitric oxide on oxidative phosphorylation in plant mitochondria. *Nitric oxide* 5(3) (2001) 261-270. <https://doi.org/10.1006/niox.2001.0353>
- [43] M.L. Orozco-Cárdenas, C.A. Ryan. Nitric oxide negatively modulates wound signaling in tomato plants. *Plant Physiol.* 130(1) (2002) 487-493. <https://doi.org/10.1104/pp.008375>
- [44] C. Garcia-Mata, R. Gay, S. Sokolovski, A. Hills, L. Lamattina, M.R. Blatt. Nitric oxide regulates K⁺ and Cl⁻ channels in guard cells through a subset of abscisic acid-evoked signaling pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100(19) (2003) 11116-11121. <https://doi.org/10.1073/pnas.1434381100>
- [45] T.A. Kursar, P.D. Coley. Contrasting modes of light acclimation in two species of the rainforest understory. *Oecologia* 121 (1999) 489–498. <https://doi.org/10.1007/s004420050955>
- [46] D.P. Marcato, L.F. Adami, R.M. Barbosa, P.S. Melo, I.R. Ferreira, L. Paula, N. Durán, A.B. Seabra. Development of a sustained-release system for nitric oxide delivery using alginate/chitosan nanoparticles. *Curr. Nanosci.* 9(1) (2013) 1-7. <https://doi.org/10.2174/157341313805117848>
- [47] A. Hidangmayum, P. Dwivedi, D. Katiyar, A. Hemantaranjan. Application of chitosan on plant responses with special reference to abiotic stress. *Physiol. Mol. Biol. Plants* 25(2) (2019) 313-326. <https://doi.org/10.1007/s12298-018-0633-1>
- [48] A. Uchida, A.T. Jagendorf, T. Hibino, T. Takabe, T. Takabe. Effects of hydrogen peroxide and nitric oxide on both salt and heat stress tolerance in rice. *Plant Sci.* 163(3) (2002) 515-523. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(02\)00159-0](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(02)00159-0)
- [49] I. Salgado, M.C. Martínez, H.C. Oliveira, L. Frungillo. Nitric oxide signaling and homeostasis in plants: a focus on nitrate reductase and S-nitrosoglutathione reductase in stress-related responses. *Braz. J. Bot.* 36(2) (2013) 89-98. <https://doi.org/10.1007/s40415-013-0013-6>
- [50] S. Kneeshaw, S. Gelineau, Y. Tada, G.J. Loake, S.H. Spoel. Selective protein denitrosylation activity of thioredoxin-h5 modulates plant immunity. *Mol. Cell.* 56(1) (2014) 153-162. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.08.003>
- [51] V. Ziogas, G. Tanou, M. Belghazi, P. Filippou, V. Fotopoulos, D. Grigorios, A. Molassiotis. Roles of sodium hydrosulfide and sodium nitroprusside as priming molecules during drought acclimation in citrus plants. *Plant Mol. Biol.* 89(4-5) (2015) 433-450. <https://doi.org/10.1007/s11103-015-0379-x>

[52] N.M. Silveira, L. Frungillo, F.C.C. Marcos, M.T. Pelegrino, M.T. Miranda, A.B. Seabra, I. Salgado, E.C. Machado, R.V. Ribeiro. Exogenous nitric oxide improves sugarcane growth and photosynthesis under water deficit. *Planta* 244(1) (2016) 181-190. <https://doi.org/10.1007/s00425-016-2501-y>