



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

MARIANA FERNANDES HERTEL

**BACTÉRIAS ASSOCIATIVAS E ÓXIDO NÍTRICO  
AUMENTAM A TOLERÂNCIA AO DÉFICIT HÍDRICO DE  
ESPÉCIES ARBÓREAS DA MATA ATLÂNTICA**

---

Londrina  
2020

MARIANA FERNANDES HERTEL

**BACTÉRIAS ASSOCIATIVAS E ÓXIDO NÍTRICO  
AUMENTAM A TOLERÂNCIA AO DÉFICIT HÍDRICO DE  
ESPÉCIES ARBÓREAS DA MATA ATLÂNTICA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. José Antonio Pimenta  
Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Renata Stolf Moreira

Londrina  
2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

H573 Hertel, Mariana Fernandes.  
Bactérias associativas e óxido nítrico aumentam a tolerância ao déficit hídrico de espécies arbóreas da Mata Atlântica / Mariana Fernandes Hertel. - Londrina, 2020.  
153 f.  
  
Orientador: José Antonio Pimenta Pimenta.  
Coorientador: Renata Stolf Moreira.  
Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, 2020.  
Inclui bibliografia.  
  
1. Fisiologia Vegetal - Tese. 2. Déficit hídrico - Tese. 3. Bactérias associativas - Tese. 4. Oxido nítrico - Tese. I. Pimenta, José Antonio Pimenta. II. , Renata Stolf Moreira. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU 574

MARIANA FERNANDES HERTEL

**BACTÉRIAS ASSOCIATIVAS E ÓXIDO NÍTRICO AUMENTAM A  
TOLERÂNCIA AO DÉFICIT HÍDRICO DE ESPÉCIES ARBÓREAS DA  
MATA ATLÂNTICA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientadora: Profa. Dra. Renata Stolf Moreira  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Dra. Lindamir Pastorini  
Universidade Estadual de Maringá - UEM

---

Dr. André Luiz Martinez de Oliveira  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Dr. Edmilson Bianchini  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Dr. Weliton da Silva  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 09 de abril de 2020.

## **AGRADECIMENTOS**

À minha família, por toda a dedicação e estímulo para que eu pudesse me dedicar à vida acadêmica.

Ao Prof. Dr. José Antonio Pimenta, meu orientador e à Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Renata Stolf Moreira, minha coorientadora, por toda a dedicação, paciência e excelente orientação.

Aos professores do Laboratório de Ecofisiologia Vegetal e professores parceiros, Prof. Dr. Halley Caixeta de Oliveira, Prof. Dr. Edmilson Bianchini, Prof.<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Claudia Bueno dos Reis Martinez, Prof. Dr. André Luiz Martinez Oliveira, Prof. Dr. José Marcelo Domingues Torezan.

À equipe do Laboratório de Biodiversidade e Restauração de Ecossistemas, pelo auxílio na coleta de sementes das espécies estudadas e pelas informações oferecidas para o desenvolvimento das mudas.

Ao Prof. Dr. André Luiz Martinez de Oliveira e ao Núcleo de Pesquisa para o Desenvolvimento e Aplicação de Biofertilizantes da UEL, por fornecerem os microrganismos utilizados neste estudo.

Aos técnicos e alunos do Laboratório de Ecofisiologia Animal pelo apoio essencial para realização das análises de laboratório.

À Prof.<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Amedea Barozzi Seabra e à equipe do Laboratório Bionano Metals (UFABC) pelo fornecimento das nanopartículas e pela receptividade no laboratório.

À Prof.<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Jaqueline Dias e ao Hugo Humberto de Araújo, da Universidade Federal de Viçosa, pela avaliação anatômica.

Aos membros da Banca de Qualificação, Prof. Dr. Marco Antonio Nogueira, Prof. Dr. Halley Caixeta de Oliveira e Prof. Dr. José Marcelo Torezan pelas excelentes sugestões.

Aos membros da Banca de Defesa, Prof.<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Lindamir Hernandez Pastorini, Prof. Edmilson Bianchini, Prof. Dr. André Luiz Martinez, Prof. Dr. Weliton José da Silva e Prof.<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Renata Stolf-Moreira por avaliar este trabalho.

Aos alunos do Laboratório de Ecofisiologia vegetal, em especial ao

Anderson, pelo companheirismo e auxílio durante as etapas do Doutorado. Pelo auxílio na desmontagem dos experimentos, e pela amizade agradeço à Tatiane, Angélica, Ligia, Eloísa, Patrícia, Lara, Karina, Diego, Bruno, Louise, Sâmela e todos que auxiliaram no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Lucas Milanez Benício, por todo apoio, amizade e por fornecer a centrífuga quando necessário.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, por viabilizar a realização do mestrado e doutorado.

Ao José Vitor por todo o companheirismo e dedicação.

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

"This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001"

HERTEL, Mariana Fernandes. **Bactérias associativas e óxido nítrico aumentam a tolerância ao déficit hídrico de espécies arbóreas da Mata Atlântica**. 2020. 154 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2020.

## RESUMO

Mudas destinadas a sítios de reflorestamento ativo devem tolerar condições adversas, dentre as quais se destaca o déficit hídrico (DH). A inoculação de bactérias associativas (BAs) e a aplicação exógena de moléculas sinalizadoras, como o óxido nítrico (NO), podem aumentar a tolerância de plantas ao DH. O objetivo deste estudo foi verificar se a inoculação com bactérias associativas, *Azospirillum brasilense* (Ab-V5) ou *Bacillus velezensis* (ZK), e se a aplicação de nanopartículas contendo um doador de óxido nítrico (NPs de NO, sem a presença de bactérias ou com inoculação) afetava o metabolismo, a fisiologia e o crescimento de mudas arbóreas neotropicais tornando-as mais tolerantes ao DH. Para isto, foram desenvolvidos dois experimentos. Um com duas espécies de Fabaceae (*Hymenaea courbaril* L., *H.c.* e *Bauhinia forficata* Link, *B.f.*) inoculadas com Ab-V5 ou ZK e submetidas ao DH por 30 dias (Capítulo 1). O segundo experimento foi desenvolvido com mudas de *Heliocarpus popayanensis* Kunth (*H.p.*) e *Cabralea canjerana* (Vell) Mart (*C.c.*) inoculadas com Ab-V5 ou ZK, ou tratadas com NPs de NO. As mudas também foram tratadas simultaneamente com uma das bactérias e NPs de NO. Mudas de todos os tratamentos foram submetidas ao DH por 3 semanas (Capítulo 2). Em ambos os experimentos foram avaliadas as trocas gasosas, a peroxidação lipídica das folhas e os parâmetros biométricos. No Capítulo 1 foram avaliados o potencial hídrico das folhas ( $\Psi_w$ ), a concentração foliar de prolina, o metabolismo do N das folhas e raízes e os parâmetros anatômicos de folhas e raízes. No capítulo 2 foram avaliados o conteúdo relativo de água (CRA) e os níveis de S-nitrosotióis das folhas. No Capítulo 1, as mudas de *H.c.* com ZK em DH apresentaram maior  $\Psi_w$  que as mudas não inoculadas (NIn). As mudas com Ab-V5 em DH apresentaram maior assimilação de N nas folhas, e ambas as estirpes estimularam o acúmulo de prolina nas folhas. As mudas de *B.f.* inoculadas com Ab-V5 em DH mantiveram a fotossíntese líquida e tiveram menor peroxidação lipídica que mudas NIn. A assimilação de N nas raízes foi mantida em mudas inoculadas com Ab-V5 e com ZK em DH. No Capítulo 2, as mudas de *H.p.* inoculadas em DH mantiveram a fotossíntese líquida e tiveram maior CRA que mudas NIn em DH, com efeito sinérgico entre as BAs e o NO. Mudas de *H.p.* com NO tiveram maior massa seca que mudas sem NO. O NO aumentou a fotossíntese líquida de mudas de *C.c.* A peroxidação lipídica foi menor nas mudas de *C.c.* em DH com BAs e houve efeito sinérgico das BAs com o NO. Foram observadas respostas de maior tolerância ao DH estimuladas pelas BAs nas quatro espécies. Também foram observadas respostas de tolerância devido ao NO nas mudas de *H.p.* e *C.c.*. O tratamento simultâneo de BAs com NO resultou num efeito sinérgico amenizando o estresse. Os tratamentos utilizados neste estudo se apresentaram como técnicas promissoras para aumentar a tolerância à seca de mudas arbóreas neotropicais destinadas a reflorestamento.

**Palavras-chave:** Seca. Árvores neotropicais. Reflorestamento. Estresse abiótico. Nanopartículas. Bactérias promotoras de crescimento em plantas.

HERTEL, Mariana Fernandes. **Associative bacteria and nitric oxide enhance drought tolerance of Atlantic Forest tree species**. 2020. 154 p. Thesis (Doctorate degree in Biological Sciences) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2020.

## GENERAL

Active reforestation seedlings must tolerate stressful conditions, of which drought is one of the main factors. The inoculation with associative bacteria (AB) and the exogenous application of signal molecules like nitric oxide can enhance plants' tolerance to drought. The aim of this study was to confirm if the inoculation with one of two AB, *Azospirillum brasilense* (Ab-V5) or *Bacillus velezensis* (ZK), and if applying nanoparticles containing a nitric oxide (NO) donor (NO NPs) with or without bacterial inoculation can affect the metabolism, physiology, and growth of Neotropical tree seedlings enhancing their tolerance to drought. To do that, two experiments were conducted. One with two Fabaceae species (*Hymenaea courbaril* L., H.c., and *Bauhinia forficata* Link, B.f.) inoculated with Ab-V5 or ZK and subjected to drought for 30 days (Chapter 1). The second experiment was with seedlings of *Heliocarpus popayanensis* Kunth (H.p.) and *Cabralea canjerana* (Vell.) Mart (C.c.) inoculated with Ab-V5 or ZK, or treated with NO NPs, or both (Ab-V5 and NO NPs, or ZK and NO NPs) subjected to drought for 3 weeks (Chapter 2). We evaluated gas exchange, leaf lipid peroxidation, and biometry in both chapters. In Chapter 1, we evaluated leaf water potential ( $\Psi_w$ ), leaf proline content, N metabolism of leaves and roots, and the anatomy of leaves and roots. In Chapter 2, we evaluated leaf relative water content (RWC), and leaf S-nitrosothiol content. In Chapter 1, H.c. seedlings with ZK showed higher  $\Psi_w$  than non-inoculated (Nin) ones under drought. The seedlings with Ab-V5 showed higher N assimilation in leaves, and both AB enhanced proline content in leaves under drought. Stressed B.f. seedlings with Ab-V5 maintained net photosynthesis and showed decreased lipid peroxidation. N assimilation in the roots was maintained in seedlings with Ab-V5 and with ZK under drought. In Chapter 2, H.p. seedlings with the ABs maintained net photosynthesis and showed higher RWC than Nin ones under drought, also a synergistic effect was observed in RWC. H.p. seedlings treated with NO showed higher dry weight than those without NO. NO increased net photosynthesis in C.c. seedlings. Both AB and NO decreased lipid peroxidation separately, but also showed a synergistic effect. The inoculation with AB enhanced tolerance to drought of the four tree species, and the treatment with NO NPs also increased tolerance in H.p. and C.c. seedlings. Synergistic effects of AB and NO NPs were observed. These tools were efficient in ameliorating drought stress in these Neotropical tree seedlings.

**Key-words:** Drought. Neotropical trees. Reforestation. Abiotic stress. Nanoparticles. Plant growth promoting bacteria.

## LISTA DE FIGURAS

### INTRODUÇÃO GERAL

**Figura 1** Mudanças de espécies arbóreas neotropicais utilizadas no presente estudo. A: *Hymenaea courbaril* (jatobá); B: *Bauhinia forficata* (pata-de-vaca); C: *Heliocarpus popayanensis* (jangadeiro); D: *Cabralea canjerana* (canjarana). Fotos: a autora..... 35

### CAPÍTULO 1

**Figura 1** Trocas gasosas de mudas de *Hymenaea courbaril* (n = 10). A: assimilação líquida de CO<sub>2</sub> (A<sub>max</sub>); B: condutância estomática (g<sub>s</sub>); C: transpiração (E); D: eficiência no uso da água (EUA); E: razão da concentração intercelular de CO<sub>2</sub> pela concentração ambiente (C<sub>i</sub>/C<sub>a</sub>); F: eficiência instantânea de carboxilação (k). Barras vazias: mudas em solo na capacidade de campo (CC); barras pontilhadas: mudas em solo em déficit hídrico (DH). NIn: mudas não inoculadas com bactérias associativas; ZK: mudas inoculadas com *Bacillus velezensis*; Ab-V5: mudas inoculadas com *Azospirillum brasilense*. Asterisco indica diferença em relação às mudas NIn CC (Contrastes ortogonais); \* = p < 0,05; \*\*\* = p < 0,001. Estilete (†) indica diferença em relação às mudas NIn DH (Contrastes ortogonais); † = p < 0,05; †† = p < 0,01; ††† = p < 0,001 ..... 59

**Figura 2** A: Potencial hídrico (Ψ<sub>w</sub>). Concentração de prolina (B), peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; C), malondialdeído (MDA; D) de folhas de mudas de *Hymenaea courbaril* (n = 5). Barras vazias: mudas em solo na capacidade de campo (CC); barras pontilhadas: mudas em solo em déficit hídrico (DH). NIn: mudas não inoculadas com bactérias associativas; ZK: mudas inoculadas com *Bacillus velezensis*; Ab-V5: mudas inoculadas com *Azospirillum brasilense*. Asterisco indica diferença em relação às mudas NIn CC (Contrastes ortogonais); \* = p < 0,05; \*\*\* = p < 0,001. Estilete (†) indica diferença em relação às mudas

NIn DH (Contrastes ortogonais); †=p<0,05; ††=p<0,01; †††=p<0,001 ..... 60

**Figura 3** Metabolismo do N em folhas e raízes de mudas de *Hymenaea courbaril* (n = 5). A: atividade da redutase do nitrato (ANR) na folha; B: ANR raiz; C: teor de nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) na folha; D: NO<sub>3</sub><sup>-</sup> raiz; E: teor de amônio na raiz (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>); F: teor de aminoácidos na folha; G: teor de aminoácidos na raiz; H: proteínas solúveis na folha. MS: massa seca. Barras vazias: mudas em solo na capacidade de campo (CC); barras pontilhadas: mudas em solo em déficit hídrico (DH). NIn: mudas não inoculadas com bactérias associativas; ZK: mudas inoculadas com *Bacillus velezensis*; Ab-V5: mudas inoculadas com *Azospirillum brasilense*. Asterisco (\*) indica diferença em relação às mudas NIn CC; \*=p<0,05; \*\*=p<0,01; \*\*\*=p<0,001. Estilete (†) indica diferença em relação às mudas NIn DH; †=p<0,05 ..... 61

**Figura 4** Biometria de mudas de *Hymenaea courbaril* (n = 10). A: massa seca (MS) da raiz; B: MS parte aérea (PA); C: MS folhas; D: área foliar total (AF); E: razão da área foliar (RAF). Barras vazias: mudas em solo na capacidade de campo (CC); barras pontilhadas: mudas em solo em déficit hídrico (DH). NIn: mudas não inoculadas com bactérias associativas; ZK: mudas inoculadas com *Bacillus velezensis*; Ab-V5: mudas inoculadas com *Azospirillum brasilense*. Asterisco (\*) indica diferença em relação às mudas NIn CC; \*=p<0,05; \*\*=p<0,01; \*\*\*=p<0,001. Estilete (†) indica diferença em relação às mudas NIn DH; †=p<0,05 ..... 62

**Figura 5** Parâmetros anatômicos de folhas e de raízes de mudas de *Hymenaea courbaril* (n = 3). Parâmetros foliares: A: espessura do limbo (EL); B: espessura do mesofilo (EM). Parâmetros radiciais: C: espessura da periderme (EP); D: espessura do córtex (EC); E: área do cilindro vascular (ACV). Barras vazias: mudas em solo na capacidade de campo. NIn: mudas não inoculadas com bactérias associativas; ZK: mudas inoculadas com *Bacillus velezensis*; Ab-V5: mudas inoculadas com

*Azospirillum brasilense*. Letras diferentes indicam diferença significativa, Anova de um fator e Teste de Fisher DMS ( $\alpha = 0,05$ )..... 63

**Figura 6** Trocas gasosas de folhas de mudas de *Bauhinia forficata* (n = 12). A: assimilação líquida de CO<sub>2</sub> ( $A_{max}$ ); B: condutância estomática ( $g_s$ ); C: transpiração ( $E$ ); D: eficiência no uso da água ( $EUA$ ); E: razão da concentração intercelular de CO<sub>2</sub> pela concentração ambiente ( $C_i/C_a$ ); F: eficiência instantânea de carboxilação ( $k$ ). Barras vazias: mudas em solo na capacidade de campo (CC); barras pontilhadas: mudas em solo em déficit hídrico (DH). NIn: mudas não inoculadas com bactérias associativas; ZK: mudas inoculadas com *Bacillus velezensis*; Ab-V5: mudas inoculadas com *Azospirillum brasilense*. Asterisco indica diferença em relação às mudas NIn na CC (Contrastes ortogonais); \*= $p < 0,05$ ; \*\*= $p < 0,01$ ; \*\*\*= $p < 0,001$  ..... 64

**Figura 7** Potencial hídrico ( $\Psi_w$ ; A), prolina (B) e concentração de malondialdeído (MDA; C) de folhas de mudas de *Bauhinia forficata* (n = 5). Barras vazias: mudas em solo na capacidade de campo (CC); barras pontilhadas: mudas em solo sob déficit hídrico moderado (DH). NIn: mudas não inoculadas com bactérias associativas; ZK: mudas inoculadas com *Bacillus velezensis*; Ab-V5: mudas inoculadas com *Azospirillum brasilense*. Asterisco (\*) indica diferença em relação às mudas NIn na CC; \*= $p < 0,05$ ; \*\*= $p < 0,01$ ; \*\*\*= $p < 0,001$ . Estilete (†) indica diferença em relação às mudas NIn em DH; †= $p < 0,05$  ..... 65

**Figura 8** Metabolismo do N de folhas e raízes de mudas de *Bauhinia forficata* (n = 5). A: atividade da redutase do nitrato (ANR) na folha; B: ANR na raiz; C: teor de nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) na folha; D: NO<sub>3</sub><sup>-</sup> raiz; E: teor de amônio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) na folha; F: NH<sub>4</sub><sup>+</sup> raiz; G: aminoácidos na folha. MS: massa seca. Barras vazias: mudas em solo na capacidade de campo (CC); barras pontilhadas: mudas em solo em déficit hídrico (DH). NIn: mudas não inoculadas com bactérias associativas; ZK: mudas inoculadas com *Bacillus velezensis*; Ab-V5: mudas inoculadas com

*Azospirillum brasilense*. Asterisco (\*) indica diferença em relação às mudas NIn CC; \*= $p < 0,05$ ; \*\*= $p < 0,01$ ; \*\*\*= $p < 0,001$ . Estilete (†) indica diferença em relação às mudas NIn em DH. †= $p < 0,05$ ; ††= $p < 0,01$ ; †††= $p < 0,001$  ..... 66

**Figura 9**

Parâmetros anatômicos de folhas e raízes de mudas de *Bauhinia forficata* (n = 4). Parâmetro foliar: A: Espessura da epiderme da face adaxial (EEAD). Parâmetros radiciais: B: espessura da periderme (EP); C: espessura do xilema secundário (EX); D: espessura do floema secundário (EF); E: espessura total da raiz (ER); F: área do cilindro vascular (ACV). Barras vazias: mudas em solo na capacidade de campo (CC). NIn: mudas não inoculadas com bactérias associativas; ZK: mudas inoculadas com *Bacillus velezensis*; Ab-V5: mudas inoculadas com *Azospirillum brasilense*. Letras diferentes indicam diferença significativa, Anova de um fator e Teste de Fisher DMS ( $\alpha = 0,05$ )..... 67

CAPÍTULO 2

**Figura 1**

Trocas gasosas de folhas de mudas de *Heliocarpus popayanensis* (n = 6).  $A_{max}$ : assimilação líquida de  $CO_2$ ;  $g_s$ : condutância estomática;  $E$ : transpiração;  $EUA_i$ : eficiência intrínseca no uso da água;  $C_i/C_a$ : Razão da concentração intercelular de  $CO_2$  pela concentração ambiente;  $k$ : eficiência instantânea de carboxilação. NIn: Mudas não inoculadas com bactérias associativas (BAs); BAs: Mudas inoculadas com BA; NO: Mudas em solo com aplicação de nanopartículas contendo doador de óxido nítrico (NO); ZK: Mudas inoculadas com *Bacillus velezensis*; Ab-V5: Mudas inoculadas com *Azospirillum brasilense*; CC: Mudas em solo na capacidade de campo; DH: Mudas em solo em déficit hídrico. Barra quadriculada: Mudas não inoculadas com BA tanto em solo na CC quanto em DH e tanto sem NO quanto com NO; barra hachurada: Mudas inoculadas com BA tanto em solo na CC quanto em DH e tanto sem NO quanto com NO. \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$

(Contrastes ortogonais: NIn CC x cada tratamento em DH; após linha tracejada S/ NO x C/ NO, e NIn x BPCPs). † = p<0,05; †† = p<0,01 (Contrastes ortogonais: NIn DH x cada tratamento em DH).....104

**Figura 2**

Conteúdo relativo de água de folhas de *Heliocarpus popayanensis* (n = 5). NIn: Mudas não inoculadas com bactérias associativas (BA); BAs: Mudas inoculadas com BA; NO: Mudas em solo com aplicação de nanopartículas contendo doador de óxido nítrico (NO); ZK: Mudas inoculadas com *Bacillus velezensis*; Ab-V5: Mudas inoculadas com *Azospirillum brasilense*; CC: Mudas em solo na capacidade de campo; DH: Mudas em solo em déficit hídrico. \* = p<0,05 (Contrastes ortogonais: NIn CC x cada tratamento em DH). † = p<0,05; †† = p<0,01 (Contrastes ortogonais: NIn DH x cada tratamento em DH).....105

**Figura 3**

Peróxido de Hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; A); Dienos Conjugados (DC; B) e S-nitrosotióis (RSNO; C) de folhas de mudas de *Heliocarpus popayanensis* (n = 5; NIn DH n = 4). NIn: Mudas não inoculadas com bactérias associativas (BA); BAs: Mudas inoculadas com BAs; NO: Mudas em solo com aplicação de nanopartículas contendo doador de óxido nítrico (NO); ZK: Mudas inoculadas com *Bacillus velezensis*; Ab-V5: Mudas inoculadas com *Azospirillum brasilense*; CC: Mudas em solo na capacidade de campo; DH: Mudas em solo em déficit hídrico. Barra quadriculada: Mudas não inoculadas com BA tanto em solo na CC quanto em DH e tanto sem NO quanto com NO; barra hachurada: Mudas inoculadas com BA tanto em solo na CC quanto em DH e tanto sem NO quanto com NO. \* = p<0,05; \*\* = <0,01; \*\*\* = p<0,001 (Contrastes ortogonais: NIn CC x cada tratamento em DH; após linha tracejada S/ NO x C/ NO, e NIn x BPCPs). † = p<0,05; †† = p<0,01; ††† = p<0,001 (Contrastes ortogonais NIn DH x cada tratamento em DH). .....107

**Figura 4**

Parâmetros biométricos de mudas de *Heliocarpus popayanensis* (n = 7; NIn DH n = 3). A: Massa seca (MS) da

parte aérea; B: Razão da massa da raiz pela massa da parte aérea; C: MS da planta; D: MS das folhas; E: Fração da massa foliar; F: Área foliar total; G: Razão da área foliar. S/ NO: Mudas em solo sem aplicação de nanopartículas contendo doador de óxido nítrico (NPs de NO); C/ NO: Mudas em solo com aplicação de NPs de NO; NIn: mudas não inoculadas com bactérias associativas (BA); BAs: mudas inoculadas com BAs; ZK: mudas inoculadas com *Bacillus velenzis*, tanto sem NO quanto com; Ab-V5: mudas inoculadas com *Azospirillum brasilense*, tanto sem NO quanto com; CC: mudas em solo na capacidade de campo; DH: mudas sob déficit hídrico. Barras quadriculadas: mudas NIn tanto em solo na CC quanto em DH, e tanto sem quanto com NO; barra hachurada: mudas inoculadas com BAs tanto em solo na CC quanto em DH, e tanto sem quanto com NO. \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$  (Contrastes ortogonais: NIn CC x cada tratamento em DH; após linha tracejada: S/ NO x C/ NO, e NIn x BPCPs). † =  $p < 0,05$  (Contrastes ortogonais NIn DH x cada tratamento em DH).....109

**Figura 5**

Trocas gasosas de folhas de mudas de *Cabralea canjerana* (n = 10). A: Assimilação líquida de CO<sub>2</sub>; B: condutância estomática; C: transpiração; D: eficiência intrínseca no uso da água; E: razão da concentração intercelular de CO<sub>2</sub> pela concentração ambiente; F: eficiência instantânea de carboxilação. NIn: mudas não inoculadas com bactérias associativas (BAs); BAs: mudas inoculadas com BAs; CC: mudas em solo na capacidade de campo; DH: mudas em solo sob déficit hídrico; S/ NO: mudas em solo sem aplicação de nanopartículas contendo doador de óxido nítrico (NO); C/ NO: mudas em solo com aplicação de NO. Barra com listras horizontais: mudas em solo sem NO, tanto na CC quanto em DH, e tanto sem BAs quanto com BAs; Barra com listras verticais: mudas em solo com NO, tanto na CC quanto em DH, e tanto sem BAs quanto com BAs. Barra quadriculada: Mudas

não inoculadas com BA tanto em solo na CC quanto em DH e tanto sem NO quanto com NO; barra hachurada: Mudas inoculadas com BA tanto em solo na CC quanto em DH e tanto sem NO quanto com NO. \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $< 0,01$  (Contrastes ortogonais: NIn CC x cada tratamento em DH; após linha tracejada: S/ NO x C/ NO, e NIn x BAs). † =  $p < 0,05$  (Contrastes ortogonais NIn DH x cada tratamento em DH).....111

**Figura 6**

Peróxido de Hidrogênio (A); Dienos Conjugados (B) e S-nitrosotióis (C) de folhas de mudas de *Cabralea canjerana* (n = 5). NIn: Mudas não inoculadas com bactérias associativas (BAs); BAs: Mudas inoculadas com BAs; ZK: Mudas inoculadas com *Bacillus velezensis*; Ab-V5: Mudas inoculadas com *Azospirillum brasilense*; CC: Mudas em solo na capacidade de campo; DH: Mudas em solo em déficit hídrico. S/ NO: mudas em solo sem aplicação de nanopartículas contendo doador de óxido nítrico (NO); C/ NO: mudas em solo com aplicação de NO. Barra com listras horizontais: mudas em solo sem NO, tanto na CC quanto em DH, e tanto sem BAs quanto com BAs; Barra com listras verticais: mudas em solo com NO, tanto na CC quanto em DH, e tanto sem BAs quanto com BAs. Barra quadriculada: Mudas não inoculadas com BA tanto em solo na CC quanto em DH e tanto sem NO quanto com NO; barra hachurada: Mudas inoculadas com BA tanto em solo na CC quanto em DH e tanto sem NO quanto com NO. \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $< 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$  (Contrastes ortogonais: NIn CC x cada tratamento em DH; após linha tracejada: S/ NO x C/ NO, e NIn x BAs). † =  $p < 0,05$ ; †† =  $p < 0,01$ ; ††† =  $p < 0,001$  (Contrastes ortogonais NIn DH x cada tratamento em DH).....112

**Figura 7**

Parâmetros biométricos de mudas de *Cabralea canjerana* (n = 10). A: Massa seca (MS) da raiz; B: MS da parte aérea; C: Razão da massa da raiz pela massa da parte aérea; D: MS da planta; E: MS das folhas; F: Fração da massa foliar; G: Área foliar total; H: Razão da área foliar. NO: Mudas em solo com aplicação de nanopartículas contendo doador de óxido nítrico

(NO); NIn: mudas não inoculadas com bactérias associativas (BAs); BAs: mudas inoculadas com BAs; ZK: mudas inoculadas com *Bacillus velentis*, sem NO e com NO; Ab-V5: mudas inoculadas com *Azospirillum brasilense*, sem NO e com NO; CC: mudas em solo na capacidade de campo; DH: mudas sob déficit hídrico. Barras quadriculadas: mudas NIn tanto em solo na CC quanto em DH, sem NO e com NO; barra hachurada: mudas inoculadas com BAs tanto em solo na CC quanto em DH, sem NO e com NO. \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$  (Contrastes ortogonais: NIn CC x cada tratamento em DH; após linha tracejada: NIn x BAs). † =  $p < 0,05$ ; †† =  $p < 0,01$  (Contrastes ortogonais: NIn DH x cada tratamento em DH) ..... 114

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

- Apêndice 1** Teste F (valor de P) para contrastes entre tratamentos de mudas de *Hymenaea courbaril* (n=10). Os contrastes foram ortogonais e previamente estabelecidos. CC: Capacidade de campo; DH: Déficit hídrico; NIn: mudas não inoculadas com bactérias associativas; ZK: mudas associadas a *Bacillus velezensis*; Ab-V5: mudas associadas a *Azospirillum brasilense*.  $A_{max}$ : assimilação líquida de CO<sub>2</sub> ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ );  $g_s$ : condutância estomática ( $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ );  $E$ : transpiração ( $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ );  $EUA_i$ : eficiência intrínseca no uso da água ( $\mu\text{molCO}_2 \text{ molH}_2\text{O}^{-1}$ );  $C_i/C_a$ : razão concentração intercelular/concentração no ambiente de CO<sub>2</sub>;  $k$ : eficiência instantânea de carboxilação ( $\mu\text{molCO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$ ) .....86
- Apêndice 2** Teste F (valor de P) para contrastes entre tratamentos de mudas de *Hymenaea courbaril* (n = 5). Os contrastes foram ortogonais e previamente estabelecidos. CC: Capacidade de campo; DH: Déficit hídrico; NIn: mudas não inoculadas com bactérias associativas; ZK: mudas associadas a *Bacillus velezensis*; Ab-V5: mudas associadas a *Azospirillum brasilense*.  $\Psi_w$ : potencial hídrico (Mpa); Prolina ( $\mu\text{mol g}^{-1}\text{MS}$  folha); H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: peróxido de hidrogênio ( $\mu\text{mol g}^{-1}\text{MS}$  folha); MDA: malondialdeído ( $\text{nmol g}^{-1}\text{MS}$  folha) .....87
- Apêndice 3** Teste F (valor de P) para contrastes entre tratamentos de mudas de *Hymenaea courbaril* (n = 5). Os contrastes foram ortogonais e previamente estabelecidos. CC: Capacidade de campo; DH: Déficit hídrico; NIn: mudas não inoculadas com bactérias associativas; ZK: mudas associadas a *Bacillus velezensis*; Ab-V5: mudas associadas a *Azospirillum brasilense*. ANR: atividade da NR ( $\text{nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{MS}$ ); NO<sub>3</sub><sup>-</sup>: nitrato ( $\mu\text{mol g}^{-1}\text{MS}$ ); NH<sub>4</sub><sup>+</sup>: amônio ( $\mu\text{mol g}^{-1}\text{MS}$ ); aa: aminoácidos ( $\mu\text{mol g}^{-1}\text{MS}$ ); proteínas solúveis ( $\text{mg g}^{-1}\text{MS}$ ) .....88
- Apêndice 4** Teste F (valor de P) para contrastes entre tratamentos de

mudas de *Hymenaea courbaril* (n = 10). Os contrastes foram ortogonais e previamente estabelecidos. CC: Capacidade de campo; DH: Déficit hídrico; NIn: mudas não inoculadas com bactérias associativas; ZK: mudas associadas a *Bacillus velezensis*; Ab-V5: mudas associadas a *Azospirillum brasilense*. MS raiz: massa seca da raiz (g), MS PA: massa seca da parte aérea (g), MS folhas (g), AF: área foliar total (cm<sup>2</sup>), FMF: fração da massa foliar (g g<sup>-1</sup>MS planta), RAF: razão da área foliar (cm<sup>2</sup> g<sup>-1</sup>MS planta), FMR: fração da massa da raiz (g g<sup>-1</sup>MS planta), R/PA: razão MS raiz/MS PA..... 89

**Apêndice 5** Teste F (valor de P) para contrastes entre tratamentos de mudas de *Bauhinia forficata* (n = 12). Os contrastes foram ortogonais e previamente estabelecidos. CC: Capacidade de campo; DH: Déficit hídrico; NIn: mudas não inoculadas com bactérias associativas; ZK: mudas associadas a *Bacillus velezensis*; Ab-V5: mudas associadas a *Azospirillum brasilense*.  $A_{max}$ : assimilação líquida de CO<sub>2</sub> (μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>);  $g_s$ : condutância estomática (mol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>);  $E$ : transpiração (mmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>);  $EUA_i$ : eficiência intrínseca no uso da água (μmolCO<sub>2</sub> molH<sub>2</sub>O<sup>-1</sup>);  $C_i/C_a$ : razão concentração intercelular/concentração no ambiente de CO<sub>2</sub>;  $k$ : eficiência instantânea de carboxilação (μmolCO<sub>2</sub> m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> Pa<sup>-1</sup>) ..... 90

**Apêndice 6** Teste F (valor de P) para contrastes entre tratamentos de mudas de *Bauhinia forficata* (n = 5). Os contrastes foram ortogonais e previamente estabelecidos. CC: Capacidade de campo; DH: Déficit hídrico; NIn: mudas não inoculadas com bactérias associativas; ZK: mudas associadas a *Bacillus velezensis*; Ab-V5: mudas associadas a *Azospirillum brasilense*.  $\Psi_w$ : potencial hídrico (Mpa); Prolina (μmol g<sup>-1</sup>MS folha); H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: peróxido de hidrogênio (μmol g<sup>-1</sup>MS folha); MDA: malondialdeído (nmol g<sup>-1</sup>MS folha) ..... 91

**Apêndice 7** Teste F (valor de P) para contrastes entre tratamentos de mudas de *Bauhinia forficata* (n = 5). Os contrastes foram ortogonais e previamente estabelecidos. CC: Capacidade de

campo; DH: Déficit hídrico; IN: mudas não inoculadas com bactérias associativas; ZK: mudas associadas a *Bacillus velezensis*; Ab-V5: mudas associadas a *Azospirillum brasilense*. ANR: atividade da NR ( $\text{nmol min}^{-1} \text{g}^{-1}\text{MS}$ );  $\text{NO}_3^-$ : nitrato ( $\mu\text{mol g}^{-1}\text{MS}$ );  $\text{NH}_4^+$ : amônio ( $\mu\text{mol g}^{-1}\text{MS}$ ); aa: aminoácidos ( $\mu\text{mol g}^{-1}\text{MS}$ ); proteínas solúveis ( $\text{mg g}^{-1}\text{MS}$ ). ..... 92

**Apêndice 8** Teste F (valor de P) para contrastes entre tratamentos de mudas de *Bauhinia forficata* ( $n = 10$ ). Os contrastes foram ortogonais e previamente estabelecidos. CC: Capacidade de campo; DH: Déficit hídrico; IN: mudas não inoculadas com bactérias associativas; ZK: mudas associadas a *Bacillus velezensis*; Ab-V5: mudas associadas a *Azospirillum brasilense*. MS raiz: massa seca da raiz (g), MS PA: massa seca da parte aérea (g), MS folhas (g), AF: área foliar total ( $\text{cm}^2$ ), FMF: fração da massa foliar ( $\text{g g}^{-1}\text{MS planta}$ ), RAF: razão da área foliar ( $\text{cm}^2 \text{g}^{-1}\text{MS planta}$ ), FMR: fração da massa da raiz ( $\text{g g}^{-1}\text{MS planta}$ ), R/PA: razão MS raiz/MS PA. ... 93

## CAPÍTULO 2

**Apêndice 1** Teste F (valor de P) para contrastes entre tratamentos de mudas de *Heliocarpus popayanensis*. Os contrastes foram ortogonais e previamente estabelecidos. CC: Capacidade de campo; DH: Déficit hídrico; IN: mudas não inoculadas com bactérias promotoras do crescimento em plantas; ZK: mudas associadas a *Bacillus* sp.; Ab-V5: mudas associadas a *Azospirillum brasilense*; S/NO: mudas em solo sem aplicação de nanopartículas contendo doador de óxido nítrico (NPs de NO); C/NO: mudas em solo com aplicação de NPs de NO.  $A_{\text{max}}$ : assimilação líquida de  $\text{CO}_2$  ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ );  $g_s$ : condutância estomática ( $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ );  $E$ : transpiração ( $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ );  $EUA_i$ : eficiência intrínseca no uso da água ( $\mu\text{molCO}_2 \text{molH}_2\text{O}^{-1}$ );  $C_i/C_a$ : razão concentração intercelular/concentração no ambiente de  $\text{CO}_2$ ;  $k$ : eficiência instantânea de carboxilação ( $\mu\text{molCO}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1} \text{Pa}^{-1}$ ). CRA: conteúdo relativo de água (%). .....129

**Apêndice 2** Teste F (valor de P) para contrastes entre tratamentos de mudas de *Heliocarpus popayanensis*. Os contrastes foram ortogonais e previamente estabelecidos. CC: Capacidade de campo; DH: Déficit hídrico; NIn: mudas não inoculadas com bactérias promotoras do crescimento em plantas; ZK: mudas associadas a *Bacillus* sp.; Ab-V5: mudas associadas a *Azospirillum brasilense*; S/NO: mudas em solo sem aplicação de nanopartículas contendo doador de óxido nítrico (NPs de NO); C/NO: mudas em solo com aplicação de NPs de NO. DC: dienos conjugados; MDA: malondialdeído; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: peróxido de hidrogênio; NO<sub>2</sub><sup>-</sup>: nitrito; RSNO: S-nitrosotióis ..... 130

**Apêndice 3** Teste F (valor de P) para contrastes entre tratamentos de mudas de *Heliocarpus popayanensis*. Os contrastes foram ortogonais e previamente estabelecidos. CC: Capacidade de campo; DH: Déficit hídrico; NIn: mudas não inoculadas com bactérias promotoras do crescimento em plantas; ZK: mudas associadas a *Bacillus* sp.; Ab-V5: mudas associadas a *Azospirillum brasilense*; S/NO: mudas em solo sem aplicação de nanopartículas contendo doador de óxido nítrico (NPs de NO); C/NO: mudas em solo com aplicação de NPs de NO. R: massa seca (MS) da raiz; PA: MS parte aérea; R/PA: razão MS raiz/MS PA; P: MS planta; F: MS folhas; FMF: fração da massa foliar; AF: área foliar total; RAF: razão da área foliar..... 133

**Apêndice 4** Teste F (valor de P) para contrastes entre tratamentos de mudas de *Cabralea canjerana*. Os contrastes foram ortogonais e previamente estabelecidos. CC: Capacidade de campo; DH: Déficit hídrico; NIn: mudas não inoculadas com bactérias promotoras do crescimento em plantas; ZK: mudas associadas a *Bacillus* sp.; Ab-V5: mudas associadas a *Azospirillum brasilense*; S/NO: mudas em solo sem aplicação de nanopartículas contendo doador de óxido nítrico (NPs de NO); C/NO: mudas em solo com aplicação de NPs de NO. A<sub>max</sub>: assimilação líquida de CO<sub>2</sub> (μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>); g<sub>s</sub>: condutância estomática (mol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>); E: transpiração (mmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>)

$^2 \text{ s}^{-1}$ );  $EUA_i$ : eficiência intrínseca no uso da água ( $\mu\text{molCO}_2 \text{ molH}_2\text{O}^{-1}$ );  $C_i/C_a$ : razão concentração intercelular/concentração no ambiente de  $\text{CO}_2$ ;  $k$ : eficiência instantânea de carboxilação ( $\mu\text{molCO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$ ). CRA: conteúdo relativo de água (%) ..... 134

**Apêndice 5** Teste F (valor de P) para contrastes entre tratamentos de mudas de *Cabralea canjerana*. Os contrastes foram ortogonais e previamente estabelecidos. CC: Capacidade de campo; DH: Déficit hídrico; NIn: mudas não inoculadas com bactérias promotoras do crescimento em plantas; ZK: mudas associadas a *Bacillus* sp.; Ab-V5: mudas associadas a *Azospirillum brasilense*; S/NO: mudas em solo sem aplicação de nanopartículas contendo doador de óxido nítrico (NPs de NO); C/NO: mudas em solo com aplicação de NPs de NO. DC: dienos conjugados;  $\text{H}_2\text{O}_2$ : peróxido de hidrogênio; RSNO: S-nitrosotióis ..... 135

**Apêndice 6** Teste F (valor de P) para contrastes entre tratamentos de mudas de *Cabralea canjerana*. Os contrastes foram ortogonais e previamente estabelecidos. CC: Capacidade de campo; DH: Déficit hídrico; NIn: mudas não inoculadas com bactérias promotoras do crescimento em plantas; ZK: mudas associadas a *Bacillus* sp.; Ab-V5: mudas associadas a *Azospirillum brasilense*; S/NO: mudas em solo sem aplicação de nanopartículas contendo doador de óxido nítrico (NPs de NO); C/NO: mudas em solo com aplicação de NPs de NO. R: massa seca (MS) da raiz; PA: MS parte aérea; R/PA: razão MS raiz/MS PA; P: MS planta; F: MS folhas; FMF: fração da massa foliar; AF: área foliar total; RAF: razão da área foliar..... 136

**Apêndice 7** Trocas gasosas e conteúdo relativo de água de folhas de mudas de *Heliocarpus popayanensis*. CC: Capacidade de campo; DH: Déficit hídrico; NIn: mudas não inoculadas com bactérias promotoras do crescimento em plantas; ZK: mudas inoculadas com *Bacillus velezensis*; Ab-V5: mudas inoculadas com *Azospirillum brasilense*; S/NO: mudas em solo sem

aplicação de nanopartículas com doador de óxido nítrico (NPs de NO); C/NO: mudas em solo com NPs de NO.  $A_{max}$ : assimilação líquida de  $CO_2$  ( $\mu mol\ m^{-2}\ s^{-1}$ );  $g_s$ : condutância estomática ( $mol\ m^{-2}\ s^{-1}$ );  $E$ : transpiração ( $mmol\ m^{-2}\ s^{-1}$ );  $EUA_i$ : eficiência intrínseca no uso da água ( $\mu molCO_2\ molH_2O^{-1}$ );  $C_i/C_a$ : razão concentração intercelular/concentração no ambiente de  $CO_2$ ;  $k$ : eficiência instantânea de carboxilação ( $\mu molCO_2\ m^{-2}\ s^{-1}\ Pa^{-1}$ ). CRA: conteúdo relativo de água (%).

Média  $\pm$  erro padrão ..... 137

**Apêndice 8** Parâmetros bioquímicos de folhas de mudas de *Heliocarpus popayanensis*. CC: Capacidade de campo; DH: Déficit hídrico; NIn: mudas não inoculadas com bactérias promotoras do crescimento em plantas; ZK: mudas inoculadas com *Bacillus velezensis*; Ab-V5: mudas inoculadas com *Azospirillum brasilense*; S/NO: mudas em solo sem aplicação de nanopartículas contendo doador de óxido nítrico (NPs de NO); C/NO: mudas em solo com aplicação de NPs de NO. DC: Dienes conjugados ( $\mu mol\ g^{-1}\ MS$ );  $H_2O_2$ : peróxido de hidrogênio ( $\mu mol\ g^{-1}\ MS$ ); RSNO: S-nitrosotióis ( $nmol\ g^{-1}\ MS$ ).

Média  $\pm$  erro padrão ..... 138

**Apêndice 9** Análise biométrica de mudas de *Heliocarpus popayanensis*. CC: Capacidade de Campo; DH: Déficit hídrico; NIn: mudas não inoculadas com bactérias promotoras do crescimento em plantas; ZK: mudas inoculadas com *Bacillus velezensis*; Ab-V5: mudas inoculadas com *Azospirillum brasilense*; S/NO: mudas em solo sem aplicação de nanopartículas com doador de óxido nítrico (NPs de NO); C/NO: mudas em solo com aplicação de NPs de NO. PA: massa seca (MS) parte aérea; R/PA: razão MS raiz/MS PA; P: MS planta; F: MS folhas; FMF: fração da massa foliar; AF: área foliar total ( $cm^2$ ); RAF: razão da área foliar ( $cm^2\ g^{-1}$ ). Média  $\pm$  erro padrão ..... 139

**Apêndice 10** Trocas gasosas e conteúdo relativo de água folíolos de mudas de *Cabralea canjerana*. CC: Capacidade de campo; DH: Déficit hídrico; NIn: mudas não inoculadas com bactérias

promotoras do crescimento em plantas; ZK: mudas inoculadas com *Bacillus velezensis*; Ab-V5: mudas inoculadas com *Azospirillum brasilense*; S/NO: mudas em solo sem aplicação de nanopartículas com doador de óxido nítrico (NPs de NO); C/NO: mudas em solo com NPs de NO.  $A_{max}$ : assimilação líquida de  $CO_2$  ( $\mu mol\ m^{-2}\ s^{-1}$ );  $g_s$ : condutância estomática ( $mol\ m^{-2}\ s^{-1}$ );  $E$ : transpiração ( $mmol\ m^{-2}\ s^{-1}$ );  $EUA_i$ : eficiência intrínseca no uso da água ( $\mu mol\ CO_2\ mol\ H_2O^{-1}$ );  $C_i/C_a$ : razão concentração intercelular/concentração no ambiente de  $CO_2$ ;  $k$ : eficiência instantânea de carboxilação ( $\mu mol\ CO_2\ m^{-2}\ s^{-1}\ Pa^{-1}$ ). CRA: conteúdo relativo de água (%). Média  $\pm$  erro padrão .. 140

**Apêndice 11** Parâmetros bioquímicos de folíolos de mudas de *Cabralea canjerana*. CC: Capacidade de campo; DH: Déficit hídrico; NIn: mudas não inoculadas com bactérias promotoras do crescimento em plantas; ZK: mudas inoculadas com *Bacillus velezensis*; Ab-V5: mudas inoculadas com *Azospirillum brasilense*; S/NO: mudas em solo sem aplicação de nanopartículas contendo doador de óxido nítrico (NPs de NO); C/NO: mudas em solo com aplicação de NPs de NO. DC: Dienos conjugados ( $\mu mol\ g^{-1}\ MS$ );  $H_2O_2$ : peróxido de hidrogênio ( $\mu mol\ g^{-1}\ MS$ ); RSNO: S-nitrosotióis ( $nmol\ g^{-1}\ MS$ ). Média  $\pm$  erro padrão ..... 141

**Apêndice 12** Parâmetros biométricos de mudas de *Cabralea canjerana*. CC: Capacidade de campo; DH: Déficit hídrico; NIn: mudas não inoculadas com bactérias promotoras do crescimento em plantas; ZK: mudas associadas a *Bacillus velezensis*; Ab-V5: mudas associadas a *Azospirillum brasilense*; S/NO: mudas em solo sem aplicação de nanopartículas contendo doador de óxido nítrico (NPs de NO); C/NO: mudas em solo com NPs de NO. R: massa seca da raiz (g); PA: massa seca da parte aérea (g); R/PA: razão da massa da raiz pela PA; P: massa seca da planta (g); F: massa seca das folhas (g); FMF: fração da massa foliar; AF: área foliar total ( $cm^2$ ); RAF: razão da área foliar ( $cm^2\ g^{-1}$ ). Média  $\pm$  erro padrão ..... 142

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ab-V5	Estirpe Ab-V5 de <i>Azospirillum brasilense</i>
ACV	Área do cilindro vascular
AF	Área foliar total
$A_{max}$	Assimilação líquida de CO <sub>2</sub>
ANR	Atividade da redutase do nitrato
BA	Bactéria associativa
CC	Capacidade de campo
Ci/Ca	Razão da concentração intercelular de CO <sub>2</sub> pela concentração ambiente
DH	Déficit hídrico
EEAB	Espessura da epiderme da face abaxial
EEAD	Espessura da epiderme da face adaxial
EC	Espessura do córtex
ECV	Espessura do cilindro vascular
EF	Espessura do floema secundário
EL	Espessura do limbo
EP	Espessura da periderme
EPE	Espessura do parênquima esponjoso
EPP	Espessura do parênquima paliçádico
ER	Espessura da raiz
EUA	Eficiência no uso da água
EX	Espessura do xilema secundário
FEV	Frequência de elementos de vaso por área do cilindro vascular
FMF	Fração da massa foliar
FMR	Fração da massa da raiz
gs	Condutância estomática
k	Eficiência instantânea de carboxilação
MDA	Malondialdeído
MPa	Mega Pascal
MS	Massa seca
NO	Óxido nítrico
NPs de NO	Nanopartículas de quitosana/TPP contendo S-nitroso-MSA

PA	Parte aérea
RAF	Razão da área foliar
UG	Umidade gravimétrica
ZK	Bacillus velezensis

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	26
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	36
<b>1</b>	
<b>CAPÍTULO 1. BACTÉRIAS ASSOCIATIVAS AUMENTAM A TOLERÂNCIA AO DÉFICIT HÍDRICO DE DUAS ESPÉCIES DE FABACEAE DA MATA ATLÂNTICA</b> .....	46
RESUMO.....	48
ABSTRACT .....	49
1.1 INTRODUÇÃO .....	50
1.2 METODOLOGIA .....	52
1.2.1 Delineamento Experimental.....	52
1.2.2 Trocas Gasosas.....	53
1.2.3 Potencial Hídrico.....	53
1.2.4 Análises Bioquímicas.....	53
1.2.5 Biometria .....	55
1.2.6 Anatomia .....	55
1.2.7 Análise Estatística .....	56
1.3 RESULTADOS.....	57
1.3.1 Hymenaea courbaril.....	57
1.3.2 Bauhinia forficata .....	63
1.4 DISCUSSÃO .....	67
1.4.1 Trocas Gasosas.....	67
1.4.2 Potencial hídrico, Prolina, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> e MDA.....	69
1.4.3 Metabolismo do N.....	71
1.4.4 Biometria .....	73
1.4.5 Anatomia .....	73
1.5 CONCLUSÕES .....	76
REFERÊNCIAS.....	78
<b>2</b>	
<b>CAPÍTULO 2. BACTÉRIAS ASSOCIATIVAS E ÓXIDO NÍTRICO AUMENTAM A TOLERÂNCIA À SECA DE DUAS ESPÉCIES</b>	

<b>ARBÓREAS NEOTROPICAIS</b> .....	94
Resumo .....	95
Abstract .....	96
2.1 INTRODUÇÃO .....	97
2.2 METODOLOGIA.....	99
2.2.1 Delineamento Experimental.....	99
2.2.2 Trocas Gasosas.....	101
2.2.3 Conteúdo Relativo de Água.....	102
2.2.4 Análises Bioquímicas.....	102
2.2.5 Parâmetros Biométricos .....	103
2.2.6 Análise Estatística .....	103
2.3 RESULTADOS.....	104
2.3.1 <i>Helicarpus popayanensis</i> .....	104
2.3.2 <i>Cabralea canjerana</i> .....	110
2.4 DISCUSSÃO .....	115
2.4.1 Trocas Gasosas.....	115
2.4.2 Conteúdo Relativo de Água.....	117
2.4.3 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , Dienos Conjugados, S-nitrosotióis .....	118
2.4.4 Parâmetros Biométricos .....	120
2.5 CONCLUSÕES .....	121
REFERÊNCIAS.....	123
<b>3 CONCLUSÃO GERAL</b> .....	143
<b>ANEXOS</b> .....	144
ANEXO A Normas da revista Environmental and Experimental Botany .....	145

## INTRODUÇÃO GERAL

O aquecimento global é considerado uma consequência do aumento dos gases de efeito estufa na atmosfera (Cook *et al.*, 2013; Sherwood *et al.*, 2014). Dentre os gases que contribuem para o aumento da temperatura, o CO<sub>2</sub> é o mais importante quantitativamente (Dixon *et al.*, 1994; Anderson *et al.*, 2016) e o desmatamento é a segunda maior fonte de emissões de carbono para a atmosfera (van der Werf *et al.*, 2009). Uma das consequências do aumento global na temperatura é a ocorrência de eventos climáticos intensos e severos, como elevada precipitação e secas prolongadas (IPCC, 2001; Trenberth *et al.*, 2014). Além da conservação de ambientes florestais, a recuperação de áreas degradadas é uma das medidas necessárias para amenizar os efeitos das mudanças climáticas (Dixon *et al.*, 1994; Ellison *et al.*, 2017), pois áreas de floresta acumulam carbono na biomassa e no solo, diminuindo a emissão líquida de CO<sub>2</sub> (Pan *et al.*, 2011; Shimamoto *et al.*, 2014; Cunningham *et al.*, 2015).

O reflorestamento ativo de mudas de espécies nativas de um Bioma é uma das estratégias de restauração de ecossistemas que pode aprimorar a estrutura, o microclima e a biodiversidade de áreas desmatadas (revisado por Cunningham *et al.*, 2015; Shoo *et al.*, 2015). O plantio de mudas arbóreas nativas tem, portanto, papel essencial na redução dos impactos negativos da exploração dos recursos naturais e, após estabelecimento e crescimento, pode promover serviços ambientais como preservação dos recursos hídricos, estocagem de carbono na biomassa vegetal e no solo, além de produtos de valor comercial como frutos e compostos medicinais (Chazdon e Coe, 1999; Aronson *et al.*, 2007; Chazdon, 2008; Rodrigues *et al.*, 2009; Pan *et al.*, 2011). Dentre os ambientes Neotropicais a serem restaurados, áreas de Mata Atlântica são primordiais, já que este é um bioma considerado hotspot, devido a sua grande diversidade, endemismo e paisagem altamente fragmentada (Mittermeier *et al.*, 2004; Ribeiro *et al.*, 2009). Entretanto, as mudas a serem plantadas devem estar aptas a sobreviver em condições de estresse, já que ambientes desflorestados tem a estrutura do solo alterada, alta incidência luminosa e, geralmente, menor umidade do ar (Nyberg *et al.*, 2012; Ellison *et al.*, 2017).

As mudas empregadas em programas de reflorestamento pertencem a diferentes grupos sucessionais e devem ser aptas a crescer rapidamente, sobreviver

às condições adversas e melhorar as condições microclimáticas do local (Douterlungne *et al.*, 2015), de modo a permitir o crescimento de outras plantas nativas, aumentando o potencial atrativo para fauna e o sombreamento (Cusack e Montagnini, 2004). Para aumentar o percentual de estabelecimento das mudas no campo, os viveiros possuem setores de aclimação que possibilitam que as mudas sofram alterações metabólicas e morfológicas que permitam maior sobrevivência (Claussen, 1996; Calzavara *et al.*, 2015; Mazzanatti *et al.*, 2016). Este processo envolve a exposição das mudas à alta luminosidade, entretanto mesmo sob estas condições as mudas são regadas regularmente (Calzavara *et al.*, 2015; Mazzanatti *et al.*, 2016). Portanto, a aclimação a condições de déficit hídrico é de extrema importância, já que em ambientes em que a floresta foi removida e os solos degradados, há diminuição da infiltração de água e da capacidade de retenção hídrica no solo (Lal, 1996; Nyberg *et al.*, 2012; Ellison *et al.*, 2017).

O déficit hídrico (DH) é um estresse que se caracteriza pela baixa disponibilidade de água para as plantas e, em ambientes tropicais, isto pode ocorrer quando há queda do potencial hídrico do solo, aumento no déficit de pressão de vapor e em condições de estresse salino (Chaves *et al.*, 2009; Wilkinson e Davies, 2010). Devido à diminuição do fluxo de água no *continuum* solo-planta-atmosfera, o DH impede o funcionamento normal do metabolismo das plantas e, em casos extremos, pode levar à morte (Wilkinson e Davies, 2010; Hamanishi e Campbell, 2011). Diversas evidências apontam que a percepção do estresse hídrico pelas raízes leva ao aumento dos níveis de ABA, que é transportado pelo xilema para a parte aérea, estimulando o fechamento estomático (Davies e Zhang, 1991; Assman, 2003; Desikan *et al.*, 2004; Wilkinson e Davies, 2010). A queda na condutância estomática ( $g_s$ ) reduz a perda de água por transpiração, amenizando a diminuição do potencial hídrico das folhas (Sperry *et al.*, 2002). Entretanto, a menor  $g_s$  diminui a entrada de CO<sub>2</sub> no meio intercelular, reduzindo, portanto a assimilação líquida de carbono (Flexas *et al.*, 2006; Wilkinson e Davies, 2010).

Processos metabólicos como a fotossíntese e a respiração geram espécies reativas de oxigênio (EROs) mesmo em condições não estressantes, e o cloroplasto é a organela que mais produz EROs, mas quando há diminuição do metabolismo fotossintético, a geração de EROs pode aumentar a níveis tóxicos (revisado por Smirnov, 1993; Carvalho, 2008). Estas moléculas podem causar danos em membranas e no aparato fotossintético, além de reagir com outras moléculas

formando compostos mais tóxicos (Smirnov, 1993; Dat *et al.*, 2000; Asada, 2006; Carvalho, 2008; Miller *et al.*, 2010). A baixa disponibilidade de CO<sub>2</sub> devido ao fechamento estomático é a principal razão para queda da fotossíntese de plantas C<sub>3</sub> em DH moderado, o que reduz a atividade de carboxilação da Rubisco (Flexas e Medrano, 2002; Flexas *et al.*, 2004; Flexas *et al.*, 2006). Com a queda das reações de carboxilação, o transporte de elétrons na membrana dos tilacóides e lamelas estromais é afetado e o oxigênio pode se tornar um dos aceptores de elétrons (Dat *et al.*, 2000). A redução parcial do O<sub>2</sub> gera EROs como oxigênio singlete (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>), radical hidroxila ( $\bullet$ OH), peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) (revisado por Smirnov, 1993; Dat *et al.*, 2000; Carvalho, 2008). Apesar dos possíveis danos oxidativos resultantes do aumento da concentração de EROs, estas moléculas, como o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, podem atuar como sinalizadoras e ativar mecanismos de tolerância a estresses abióticos interagindo com outras moléculas sinalizadoras, como óxido nítrico e hormônios (Dat *et al.*, 2000; Cui *et al.*, 2011; Qiao *et al.*, 2014; Niu e Liao, 2016).

Além dos possíveis efeitos deletérios dos danos oxidativos em plantas em DH, de maneira geral, a absorção de nutrientes do solo e assimilação destes em moléculas orgânicas são afetadas negativamente (Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2010; Rouphael *et al.*, 2012; Bista *et al.*, 2018). A absorção e assimilação do nitrogênio são essenciais para os processos metabólicos como um todo, pois este elemento integra o metabolismo do carbono durante a síntese de aminoácidos, além de constituir moléculas como enzimas e ácidos nucleicos (Foyer *et al.*, 1998; Pallardy, 2008). Em DH, a atividade de enzimas-chave do metabolismo do N, como a redutase do nitrato (NR), pode diminuir, tendo consequências negativas para a síntese de aminoácidos e outras moléculas (Foyer *et al.*, 1998; Garg *et al.*, 2001; Correia *et al.*, 2005; Fresneau *et al.*, 2007). A NR reduz o nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) absorvido do solo a nitrito (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) no citosol, sendo o primeiro passo da assimilação desta forma inorgânica de N (Solomonson e Barber, 1990; Foyer *et al.*, 1998). A atividade desta enzima pode ocorrer tanto nas raízes, quanto nas folhas, e o principal órgão de atividade muda de acordo com as características ecológicas das espécies (Aidar *et al.*, 2003; Oliveira *et al.*, 2017; Debiassi *et al.*, 2019).

Diante dos efeitos deletérios causados por estresses abióticos, as plantas apresentam diversas respostas de tolerância e aclimatação que podem ser metabólicas, fisiológicas, biométricas e anatômicas. Dentre as respostas fisiológicas

podem se destacar os mecanismos de dissipação de energia especialmente nos cloroplastos, como o fluxo cíclico de elétrons no fotossistema I, a perda de energia na forma de calor por pigmentos protetores e a fotorrespiração (Osmond e Grace, 1995; Noctor *et al.*, 2002; Asada, 2006; Franco *et al.*, 2007; Voss *et al.*, 2013). Estes mecanismos protegem o aparato fotossintético do excesso de energia luminosa, evitando a fotoinibição crônica. Outras respostas de tolerância ao DH envolvem acúmulo de solutos compatíveis como a prolina, o que reduz o potencial osmótico e, portanto, mantém a absorção de água, evitando a perda da turgescência e permitindo a manutenção do metabolismo (Garg *et al.*, 2001; Ashraf e Foolad, 2007; Chaves *et al.*, 2009; Szabados e Saviouré, 2010). Quanto às respostas biométricas, as plantas podem manter o crescimento das raízes em detrimento do crescimento da parte aérea, aumentando a proporção da área de absorção de água em razão da área de perda de água (Mokany *et al.*, 2006; Bogeat-Tiboulot *et al.*, 2007; Poorter *et al.*, 2012), além de apresentarem senescência e abscisão foliar, diminuindo a superfície transpirante e mantendo o balanço hídrico (Munné-Bosch e Alegre, 2004; Chaves *et al.*, 2009).

As características anatômicas das folhas e das raízes que as plantas possuem quando submetidas ao DH podem aumentar a tolerância à restrição hídrica, além de aumentar a probabilidade de aclimatação a condições que podem ocorrer de maneira simultânea com o DH, como alta intensidade luminosa, o que geralmente ocorre em sítios de reflorestamento (Ellison *et al.*, 2017). Plantas com folhas que apresentam maior proporção de tecidos fotossintetizantes como o parênquima paliádico e o parênquima lacunoso (PL) podem aumentar a assimilação de CO<sub>2</sub>, tanto pela maior proporção de cloroplastos, quanto pela maior difusão do CO<sub>2</sub> no mesófilo pelos espaços intercelulares do PL (Tomás *et al.*, 2013; Crang *et al.*, 2018), o que pode favorecer o crescimento em condições de restrição hídrica. Quanto à anatomia das raízes, as plantas em crescimento secundário podem apresentar grande investimento em tecidos de proteção, como a periderme (Wunderling *et al.*, 2018), que diminui a entrada de patógenos tanto nos caules quanto em raízes e diminuiu a perda de água dos tecidos internos (Lulai e Corsini, 1998; Lenzian, 2006).

As respostas de tolerância ao DH podem ser estimuladas por microrganismos (Wang *et al.*, 2012; Cohen *et al.*, 2015; Tiepo *et al.*, 2018) ou por moléculas sinalizadoras aplicadas de maneira exógena de modo a amenizar o efeito do

estresse (Lei *et al.*, 2007; Silveira *et al.*, 2016). A inoculação de plantas com bactérias associativas, também chamadas de bactérias promotoras do crescimento em plantas, tem sido utilizada em experimentos de campo desde o início dos anos 1980, especialmente com bactérias do gênero *Azospirillum* (Bashan e de-Bashan, 2010) e, a partir desta década, diversos estudos com plantas cultivadas têm demonstrado vantagens da inoculação com bactérias associativas não simbióticas (Arkhipova *et al.*, 2005; Molina-Favero *et al.*, 2008; Bashan e de-Bashan, 2010; Hungria *et al.*, 2010, Calzavara *et al.*, 2018). Dentre as respostas apresentadas por plantas inoculadas estão, aumento nos pigmentos fotossintéticos (Grover *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2019), aumento do conteúdo de nitrogênio (Hungria *et al.*, 2010), aumento da atividade da redutase do nitrato (El-Komy *et al.*, 2003), aumento da assimilação de CO<sub>2</sub> (Tiepo *et al.*, 2018), melhora na resposta antioxidante (Sandhya *et al.*, 2010; Tiepo *et al.*, 2020), aumento da concentração de prolina (Sandhya *et al.*, 2010; Shahzad *et al.*, 2017), aumento na produtividade de grãos (Hungria *et al.*, 2010), crescimento de raízes (Molina-Favero *et al.*, 2008; Park *et al.*, 2017), aumento da massa seca (Mehnaz e Lazarovits, 2006; Grover *et al.*, 2013) e aumento do conteúdo relativo de água e potencial hídrico (Marulanda *et al.*, 2009; Vardharajula *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2013).

Dentre os mecanismos das bactérias que resultam no aumento do crescimento e tolerância a estresses estão a produção de hormônios como auxinas (Lambrecht *et al.*, 2000; Idris *et al.*, 2007; Fukami *et al.*, 2018a), citocininas (Arkhipova *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2013) e ácido abscísico (ABA) (Cohen *et al.*, 2015; Shahzad *et al.*, 2017). Estas bactérias também podem aumentar a disponibilidade de nutrientes solubilizando fosfatos e minerais que contém potássio (Rodríguez e Fraga, 1999), e pela fixação biológica de nitrogênio (Bashan e de-Bashan, 2010; Hayat *et al.*, 2010). A promoção do crescimento pode se dar por um destes mecanismos ou, mais provavelmente, por vários mecanismos que resultam em um efeito aditivo (Bashan e de-Bashan, 2010), demonstrando que a hipótese aditiva proposta por Bashan e Levanov (1990) para plantas inoculadas com *Azospirillum*, pode ser a principal responsável pelo efeito de diferentes bactérias associativas no metabolismo das plantas.

Diversos estudos demonstram que a inoculação com bactérias associativas pode aumentar a tolerância das plantas a estresses bióticos e abióticos, incluindo déficit hídrico (Pérez-García *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2012; Pandey *et al.*, 2013;

Romero *et al.*, 2014; Shahzad *et al.*, 2017; Fukami *et al.*, 2018b). Entretanto, apesar da inoculação ser uma técnica promissora para amenizar estresses e estimular o crescimento em diversas espécies de plantas, poucos estudos utilizaram plantas nativas de determinado Bioma (por exemplo, Rincón *et al.*, 2008; Estes *et al.*, 2004; Bashan *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2013; Armada *et al.*, 2018), e espécies arbóreas (por exemplo, Rodríguez-Barrueco *et al.*, 1991; Zaady e Perevolotsky, 1995; Rincón *et al.*, 2008; Santos *et al.*, 2018; Tiepo *et al.*, 2018; Souza *et al.*, 2020; Tiepo *et al.*, 2020).

Estudos recentes com espécies arbóreas neotropicais inoculadas com bactérias associativas têm demonstrado resultados promissores. Souza *et al.* (2020) observaram que a inoculação das sementes de espécies de diferentes grupos sucessionais aumentou a germinação e o vigor das plântulas, especialmente de espécies pioneiras. Os resultados encontrados por Souza *et al.* (2020) demonstraram que a aplicação de bactérias em viveiros de produção de mudas de reflorestamento pode melhorar a eficiência e a qualidade da produção. Dois estudos desenvolvidos por Tiepo *et al.* (2018, 2020) observaram melhora da tolerância ao DH em mudas de espécies arbóreas em experimentos de casa de vegetação. Tiepo *et al.* (2018) observaram aumento da fotossíntese líquida e diminuição da peroxidação lipídica em mudas inoculadas submetidas ao DH. Em estudo mais recente, Tiepo *et al.* (2020) observaram aumento da resposta antioxidante de mudas em DH inoculadas com *Azospirillum brasiliense* e *Bacillus velezensis* (ainda identificada apenas como *Bacillus* sp.). Entretanto, o efeito das bactérias deve ser verificado em mais espécies com diferentes graus de tolerância à sombra e que ocupam diferentes nichos para que seja possível a padronização dos inóculos a serem aplicados.

Além da inoculação de microrganismos que afetam o metabolismo das plantas, moléculas que atuam como sinalizadores de respostas a estresses podem ser aplicadas exogenamente para estimular respostas de tolerância (He *et al.*, 2005; Oliveira *et al.*, 2016; Silveira *et al.*, 2016). O óxido nítrico (NO) é uma espécie reativa de nitrogênio que atua em diversos processos metabólicos como germinação, florescimento, senescência, e em respostas a estresses bióticos e abióticos como o estresse salino e o DH (Neill *et al.*, 2008; Nabi *et al.*, 2019). Este radical livre gasoso tem papel na resposta a diversos hormônios vegetais como auxinas, giberelinas, ABA e tem sua concentração endógena aumentada por estas moléculas, assim como pode estimular a síntese e acúmulo destas (Freschi, 2013; Prakash *et al.*,

2019).

Um dos principais mecanismos de transdução de sinal do NO é a S-nitrosilação de resíduos de cisteína de grupos tióis, formando S-nitrosotióis (Freschi, 2013; Nabi *et al.*, 2019). Esta é uma transformação pós-traducional reversível que modula moléculas como enzimas, receptores e proteínas de transdução de sinal de fitormônios (Astier e Lindermayr, 2012; Terrile *et al.*, 2012; Feng *et al.*, 2013). Um dos mais abundantes S-nitrosotióis em plantas é a S-nitrosoglutationa (GSNO), que é considerada a principal fonte de NO endógeno e é intermediária na regulação de processos em que o NO atua, como regulação da expressão gênica e respostas a diversos estresses (Begara-Morales *et al.*, 2018; Nabi *et al.*, 2019). Devido à toxicidade do NO em altas concentrações, as plantas possuem mecanismos de regulação de seus níveis e a principal via enzimática da regulação dos S-nitrosotióis é a S-nitrosoglutationa redutase (GSNOR) (Salgado *et al.*, 2013; Nabi *et al.*, 2019). A GSNO pode transferir o NO para outros grupos tióis através da transnitrosilação, assim, a diminuição dos níveis de GSNO via GSNOR diminuem a probabilidade de formação de S-nitrosotióis e, também a disponibilidade de NO no meio celular, já que a enzima reduz a GSNO a glutatona dissulfeto e NH<sub>3</sub> (Salgado *et al.*, 2013).

O NO induz respostas de tolerância a diversos estresses abióticos, como o estresse por metais pesados (Bai *et al.*, 2014; Mostofa *et al.*, 2014; Khairy *et al.*, 2016; Mohamed *et al.*, 2016), o estresse salino (Li *et al.*, 2008; Oliveira *et al.*, 2016) e o déficit hídrico (Farooq *et al.*, 2009; Gan *et al.*, 2015; Silveira *et al.*, 2016). As respostas mediadas pelo NO, seja ele de origem endógena ou exógena, envolvem a diminuição do dano oxidativo, como a peroxidação lipídica, tanto pela remoção de EROs quanto pelo aumento da atividade de enzimas antioxidantes (Li *et al.*, 2008; Farooq *et al.*, 2009; Gan *et al.*, 2015); mudanças na arquitetura das raízes (Kopyra e Gwózdź, 2003); aumento do crescimento (Oliveira *et al.*, 2016; Gadelha *et al.*, 2017); diminuição da concentração de íons tóxicos sob estresse salino (Gadelha *et al.*, 2017); aumento da fotossíntese (Silveira *et al.*, 2016); aumento do conteúdo relativo de água (Gan *et al.*, 2015; Silveira *et al.*, 2016) e aumento do conteúdo de clorofila (Oliveira *et al.*, 2016).

A aplicação de moléculas doadoras de NO de maneira exógena em plantas estimula respostas de tolerância a estresses (Silveira *et al.*, 2016; Nabi *et al.*, 2019; Santisree *et al.*, 2019). As moléculas doadoras podem ser o nitroprussiato de sódio (SNP) e S-nitrosotióis como a S-nitroso-glutationa e o S-nitroso-MSA (MSA: ácido

mercaptosuccínico) (Farooq *et al.*, 2009; Kong *et al.*, 2016; Oliveira *et al.*, 2016; Silveira *et al.*, 2016). Estas moléculas são importantes para a eficácia da exposição ao NO, já que este é um gás com meia-vida de aproximadamente 5 s (Stamler *et al.*, 1992). Entretanto, como altas concentrações de óxido nítrico podem ser tóxicas, pois o NO pode reagir com outras moléculas que podem causar danos em membranas e outros componentes celulares (Groß *et al.*, 2013; Hill *et al.*, 2010), a liberação do NO para os tecidos das plantas deve ser gradual, evitando picos de concentração. Uma maneira eficiente para liberação controlada de NO é a nanoencapsulação das moléculas doadoras, pois a nanopartícula evita que a molécula doadora de NO seja degradada precocemente quando exposta à radiação solar e altas temperaturas, permitindo a liberação lenta de NO e aumentando os efeitos positivos deste nas plantas (Seabra *et al.*, 2014; Lopes-Oliveira *et al.*, 2019). As nanopartículas utilizadas podem ser metálicas, ou de origem biológica, como a quitosana, as quais são menos danosas para aplicação no solo (Seabra *et al.*, 2014).

Um estudo pioneiro com aplicação de nanopartículas de quitosana/TPP contendo S-nitroso-MSA como doador de NO (NPs de NO) em plantas foi realizado por Oliveira *et al.* (2016). Estes autores aplicaram em plantas de milho submetidas ao estresse salino tanto o doador livre, quanto o nanoencapsulado, e verificaram que o tratamento com as NPs de NO foi mais eficaz na melhora do estresse (Oliveira *et al.*, 2016). Mais recentemente, Lopes-Oliveira *et al.* (2019), também utilizando S-nitroso-MSA, verificaram maior eficácia das NPs de NO na melhora das respostas de mudas arbóreas expostas a alta luminosidade. Estes autores aplicaram os doadores de NO no substrato de espécies arbóreas neotropicais em viveiro de mudas, e verificaram que as NPs de NO podem aumentar a aclimação destas plantas, melhorando a qualidade de mudas destinadas ao reflorestamento (Lopes-Oliveira *et al.*, 2019).

A aplicação destas diferentes ferramentas pode aumentar o grau de tolerância a estresses de mudas arbóreas destinadas a programas de reflorestamento. Dentre as espécies arbóreas neotropicais recomendadas por especialistas em viveiro para plantio em sítios de reflorestamento ativo de áreas de Mata Atlântica no sul do Brasil se destacam espécies como *Hymenaea courbaril* L. (Fabaceae, tolerante à sombra; Souza e Válio 1999), *Bauhinia forficata* Link (Fabaceae, tolerante à sombra; Silva e Soares-Silva, 2000), *Heliocarpus popayanensis* Kunth (Malvaceae, intolerante à sombra; Lorenzi, 2008) e *Cabralea canjerana* (Vell.) Mart (Meliaceae, tolerante à

sombra; Aimi *et al.* 2020).

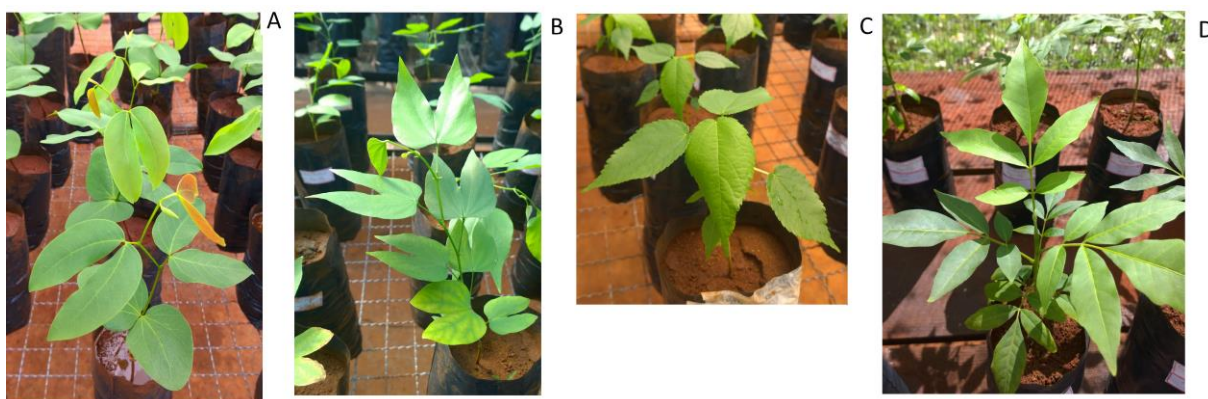
Estas espécies apresentam características importantes como altas taxas de crescimento (intolerantes à sombra), promovendo sombreamento e excluindo invasoras como gramíneas (Rodrigues *et al.*, 2009, Douterlungne *et al.*, 2015). As espécies tolerantes à sombra de crescimento mais lento podem aumentar a disponibilidade de nutrientes do solo rizosférico, já que, devido à maior exsudação de suas raízes elas podem favorecer o crescimento de microrganismos (principalmente bactérias) na rizosfera aumentando, portanto, a ciclagem de nutrientes (Kuzyakov e Blagodatskaya 2015; Rondina *et al.*, 2019). A inoculação prévia com bactérias associativas das mudas a serem plantadas pode acelerar este processo rizosférico, já que existe um mecanismo de retroalimentação entre plantas e bactérias (Canarini *et al.*, 2019). Após o estabelecimento e a maturidade reprodutiva, estas plantas podem atrair membros da fauna como mariposas polinizadoras de *B. forficata* (Neto, 2013), dispersores de sementes de *H. courbaril* como a cutia (*Dasyprocta* spp., Rodentia) (Asquith *et al.*, 1999) e aves que dispersam sementes de *C. canjerana* (Pizo, 1997).

A família Fabaceae é uma das famílias com maior número de espécies em fragmentos de Mata Atlântica do Sul do Brasil (Silva e Soares-Silva, 2000) e as espécies desta família utilizadas neste estudo são *Hymenaea courbaril* (Subfamília Caesalpinioideae; jatobá; Figura 1 A) que é uma árvore tolerante à sombra que atinge o dossel (Locosselli *et al.*, 2017) e *Bauhinia forficata* (Subfamília Caesalpinioideae; pata-de-vaca; Figura 1 B), árvore tolerante à sombra que ocupa o subosque de fragmento de Floresta Estacional Semidecidual do Sul Brasil (Silva e Soares-Silva, 2000). Ambas as espécies apresentam compostos com propriedades medicinais (Miyake *et al.*, 2006; Pepato *et al.*, 2005; Bezerra *et al.*, 2013).

*Heliocarpus popayanensis* (Malvaceae; jangadeiro; Figura 1 C) é uma espécie que ocorre em áreas de Floresta Estacional Semidecidual do Sul do Brasil (Zama *et al.*, 2012; Rossetto e Vieira, 2013) recomendada para plantio em áreas de reflorestamento devido a seu rápido crescimento. *Cabralea canjerana* (canjarana; Figura 1 D) pertence à família Meliaceae, que é uma das famílias com maior número de espécies arbóreas no Parque Estadual Mata dos Godoy (Rossetto e Vieira, 2013), um dos fragmentos de Floresta Estacional Semidecidual mais importantes do norte do Paraná (Vicente, 2006). Esta espécie atinge o dossel (Silva e Soares-Silva, 2000) e apresenta compostos com potencial uso medicinal (Rovedder *et al.*, 2016).

Diante do exposto, o objetivo deste estudo foi verificar se a inoculação com bactérias associativas e a aplicação de nanopartículas contendo S-nitroso-MSA no solo de mudas de espécies arbóreas neotropicais nativas da Mata Atlântica altera a fisiologia, o metabolismo, os parâmetros biométricos e a anatomia destas plantas de modo a torná-las mais tolerantes ao DH. Para isto, foram desenvolvidos dois experimentos em condições de casa de vegetação, sendo duas espécies em cada experimento. As duas espécies de Fabaceae, *H. courbaril* e *B. forficata*, foram submetidas ao DH por 30 dias e inoculadas com uma das bactérias associativas, *Azospirillum brasilense* ou *Bacillus velezensis* (Capítulo 1). Já as mudas de *Heliocarpus popayanensis* e *Cabralea canjerana* foram inoculadas com uma das estirpes bacterianas, ou não foram inoculadas e tratadas com NPs de NO, ou tratadas simultaneamente com uma das bactérias associativas e NPs de NO. Estas mudas foram mantidas por 3 semanas sob restrição hídrica (Capítulo 2).

A hipótese levantada foi que tanto a inoculação com bactérias associativas quanto a aplicação de NPs de NO diminuem os efeitos danosos do DH, amenizando a queda do metabolismo fotossintético e o do N, mantendo a turgescência das folhas, diminuindo a peroxidação lipídica e mantendo o crescimento.



**Figura 1.** Mudas de espécies arbóreas neotropicais utilizadas no presente estudo. A: *Hymenaea courbaril* (jatobá); B: *Bauhinia forficata* (pata-de-vaca); C: *Heliocarpus popayanensis* (jangadeiro); D: *Cabralea canjerana* (canjarana). Fotos: a autora.

## REFERÊNCIAS

- Aidar, M.P.M., Schmidt, S., Moss, G., Stewart, G.R., Joly, C.A., 2003. Nitrogen use strategies of neotropical rainforest trees in threatened Atlantic Forest. *Plant, Cell and Environment* 26, 389-399.
- Aimi, S.C., Araujo, M.M., Tabaldi, L.A., Tonetto, T. da S., Zavistanovicz, T.C., Berghetti, A.L.P., 2020. Shading as a determinant factor for the survival and growth of *Cabralea canjerana* in Southern Brazil. *Cerne* 26, 349-355.
- Anderson, T.R., Hawkins, E., Jones, P.D., 2016. CO<sub>2</sub>, the greenhouse effect and global warming: from the pioneering work of Arrhenius and Callendar to today's Earth System Models. *Endeavour* 40,179-187.
- Arkhipova, T.N., Veselov, S.U., Melentiev, A.I., Martynenko, E.V., Kudoyarova, G.R., 2005. Ability of bacterium *Bacillus subtilis* to produce cytokinins and to influence the growth and endogenous hormone content of lettuce plants. *Plant and Soil* 272, 201-209.
- Armada, E., Leite, M.F.A., Medina, A., Azcón, R., Kuramae, E.E., 2018. Native bacteria promote plant growth under drought stress condition without impacting the rhizomicrobiome. *FEMS Microbiology Ecology* 94, fiy092.
- Aronson, J., Milton, S.J., Blignaut, J.N., 2007. Restoring natural capital: definitions and rationale. In: *Restoring natural capital: science, business, and practice*. Island Press, Washington, pp. 3-8.
- Asada, K., 2006. Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiology* 141, 391-396.
- Ashraf, M., Foolad, M.R., 2007. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environmental and Experimental Botany* 59, 206-216.
- Asquith, N.M., Terborgh, J., Arnold, A.E., Riveros, C.M., 1999. The fruits the agouti ate: *Hymenaea courbaril* seed fate when its disperser is absent. *Journal of Tropical Ecology* 15, 229-235.
- Assman, S.M., 2003. *OPEN STOMATA1* opens the door to ABA signaling in *Arabidopsis* guard cells. *Trends in Plant Science* 8, 151-153.
- Astier, J., Lindermayr, C., 2012. Nitric Oxide-dependent posttranslational modification in plants: an update. *International Journal of Molecular Sciences* 13, 15193-15208.
- Bai, X.Y., Dong, Y.J., Wang, Q.H., Xu, L.L., Kong, J., Liu, S., 2014. Effects of lead and nitric oxide on photosynthesis, antioxidative ability, and mineral element content of perennial ryegrass. *Biologia Plantarum* 59, 163–170.
- Bashan, Y., Levanony, H., 1990. Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as a challenge for agriculture. *Canadian Journal of Microbiology* 36, 591–608.
- Bashan, Y., de-Bashan, L.E., 2010. How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth - A critical assessment. *Advances in Agronomy* 108, 77-136.
- Bashan, Y., Salazar, B.G., Moreno, M., Lopez, B.R., Linderman, R.G., 2012. Restoration of eroded soil in the Sonoran Desert with native leguminous trees using plant growth-promoting microorganisms and limited amounts of compost and water. *Journal of Environmental Management* 102, 26-36.
- Begara-Morales, J.C., Chaki, M., Valderrama, R., Sanchez-Calvo, B., Mata-Perez, C., Padilla, M.N., Corpas, F.J., Barroso, J.B., 2018. Nitric oxide buffering and conditional nitric oxide release in stress response. *Journal of Experimental Botany* 69, 3425–3438.

- Bezerra, G.B., Góis, R.W.S., Brito, T.S., Lima, F.J.B., Bandeira, M.A.M., Romero, N.R., Magalhães, P.J.C., Santiago, G.M.P., 2013. Phytochemical study guided by the myorelaxant activity of the crude extract, fractions and constituent from stem bark of *Hymenaea courbaril* L. *Journal of Ethnopharmacology* 149, 62-69.
- Bista, D.R., Heckathorn, S.A., Jayawardena, D.M., Mishra, S., Boldt, J.K., 2018. Effects of drought on nutrient uptake and the levels of nutrient-uptake proteins in roots of drought-sensitive and -tolerant grasses. *Plants* 7, 28.
- Bogeat-Triboulout, M-B., Brosché, M., Renaut, J., Jouve, L., Le Thiec, D., Fayyaz, P., Vinocur, B., Witters, E., Laukens, K., Teichmann, T., Altman, A., Hausman, J-F., Polle, A., Kangasjärvi, J., Dreyer, E., 2007. Gradual soil water depletion results in reversible changes of gene expression, protein profiles, ecophysiology, and growth performance in *Populus euphratica*, a poplar growing in arid regions. *Plant Physiology* 143, 876-892.
- 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.
- Calzavara, A.K., Paiva, P.H.G., Gabriel, L.C., Oliveira, A.L.M., Milani, K., Oliveira, H.C., Bianchini, E., Pimenta, J.A., Oliveira, M.C.N., Dias-Pereira, J., Stolf-Moreira, R., 2018. Associative bacteria influence maize (*Zea mays* L.) growth, physiology and root anatomy under different nitrogen levels. *Plant Biology* 20, 870-878.
- Canarini, A., Kaiser, C., Merchant, A., Richter, A., Wanek, W., 2019. Root exudation of primary metabolites: mechanisms and their roles in plant responses to environmental stimuli. *Frontiers in Plant Science* 10, 157.
- Carvalho, M.H.C., 2008. Drought stress and reactive oxygen species. *Plant Signaling & Behavior* 3, 156-165.
- Chaves, M.M., Flexas, J., Pinheiro, C., 2009. Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Annals of Botany* 103, 551-560.
- Chazdon, R.L., 2008. Beyond deforestation: Restoring forests and ecosystem services on degraded lands. *Science* 320, 1458-1460.
- Chazdon, R.L., Coe, F.G., 1999. Ethnobotany of woody species in second-growth, old-growth, and selectively logged forests of northeastern Costa Rica. *Conservation Biology* 13, 1312-1322.
- Claussen, J.W., 1996. Acclimation abilities of three tropical rainforest seedlings to an increase in light intensity. *Forest Ecology and Management* 80, 245-255.
- Cohen, A.C., Bottini, R., Pontin, M., Berli, F.J., Moreno, D., Boccanlandro, H., Travaglia, C.N., Piccoli, P.N., 2015. *Azospirillum brasilense* ameliorates the response of *Arabidopsis thaliana* to drought mainly via enhancement of ABA levels. *Physiologia Plantarum* 153, 79-90.
- Cook, J., Nuccitelli, D., Green, S.A., Richardson, M., Winkler, B., Painting, R., Way, R., Jacobs, P., Skuce, A., 2013. Quantifying the consensus on anthropogenic global warming in the scientific literature. *Environmental Research Letters* 8, 024024.
- Correia, M.J., Fonseca, F., Azedo-Silva, J., Dias, C., David, M.M., Barrote, I., Osório, M.L., Osório, J., 2005. Effects of water deficit on the activity of nitrate reductase and content of sugars, nitrate and free amino acids in the leaves and roots of sunflower and white lupin plants growing under two nutrient supply regimes. *Physiologia Plantarum* 124, 61-70.
- Crang, R., Lyons-Sobaski, S., Wise, R., 2018. Leaves. In:\_\_\_\_\_ (Eds.) *Plant Anatomy*. Springer, Cham, pp 395-441.

- Cui, J.X., Zhou, Y.H., Ding, J.G., Xia, X.J., Shi, K., Chen, S.C., Asami, T., Chen, Z., Yu, J.Q., 2011. Role of nitric oxide in hydrogen peroxide-dependent induction of abiotic stress tolerance by brassinosteroids in cucumber. *Plant, Cell and Environment* 34, 347-358.
- Cunningham, S.C., Mac Nally, R., Baker, P.J., Cavagnaro, T.R., Beringer, J., Thomson, J.R., Thompson, R.M., 2015. Balancing the environmental benefits of reforestation in agricultural regions. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 17, 301-317.
- Cusack, D., Montagnini, F., 2004. The role of native species plantations in recovery of understory woody diversity in degraded pasturelands of Costa Rica. *Forest Ecology and Management* 188, 1-15.
- Dat, J., Vandenabeele, S., Vranová, E., Van Montagu, M., Inzé, D., Van Breusegem, F., 2000. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cellular and Molecular Life Sciences* 57, 779-795.
- Davies, W.J., Zhang, J., 1991. Root signals and the regulation of growth and development of plants in drying soil. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 42, 55-76.
- Debiasi, T.V., Calzavara, A.K., Silva, L.M.I., da Silva, J.G., Bianchini, E., Pimenta, J.A., Stolf-Moreira, R., Aidar, M.P.M., Sodek, L., Oliveira, H.C., 2019. Nitrogen metabolism of Neotropical tree seedlings with contrasting ecological characteristics. *Acta Physiologiae Plantarum* 41, 131.
- Desikan, R., Cheung, M.K., Bright, J., Henson, D., Hancock, J.T., Neill, S.J., 2004. ABA, hydrogen peroxide and nitric oxide signalling in stomatal guard cells. *Journal of Experimental Botany* 55, 205-212.
- Dixon, R.K., Solomon, A.M., Brown, S., Houghton, R.A., Trexler, M.C., Wisniewski, J., 1994. Carbon pools and flux of global forest ecosystems. *Science* 263, 185-190.
- Douterlungne, D., Ferguson, B.G., Siddique, I., Soto-Pinto, L., Jiménez-Ferrer, G., Gavito, M.E., 2015. Microsite determinants of variability in seedling and cutting establishment in tropical forest restoration plantations. *Restoration Ecology* 23, 861-871.
- El-Komy, H.M., Hamdia, M.A., Abd El-Baki, G.K., 2003. Nitrate reductase in wheat plants grown under water stress and inoculated with *Azospirillum* spp. *Biologia Plantarum* 46, 281-287.
- Ellison, D., Morris, C.E., Locatelli, B., Sheil, D., Cohen, J., Murdiyarto, D., Gutierrez, V., van Noordwijk, M., Creed, I.F., Pokorny, J., Gaveau, D., Spracklen, D.V., Tobella, A.B., Ilstedt, U., Teuling, A.J., *et al.*, 2017. Trees, forests and water: Cool insights for a hot world. *Global Environment Change* 43, 51-61.
- Estes, B.L., Enebak, S.A., Chappelka, A.H., 2004. Loblolly pine seedling growth after inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria and ozone exposure. *Canadian Journal of Forest Research* 34, 1410-1416.
- Farooq, M., Basra, S.M.A., Wahid, A., Rehman, H., 2009. Exogenously applied nitric oxide enhances the drought tolerance in fine grain aromatic rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Agronomy and Crop Science* 195, 254-261.
- Feng, J., Wang, C., Chen, Q., Chen, H., Ren, B., Li, X., Zuo, J., 2013. S-nitrosylation of phosphotransfer proteins represses cytokinin signaling. *Nature* 4, 1529-1529.
- Flexas, J., Bota, J., Loreto, F., Cornic, G., Sharkey, T.D., 2004. Diffusive and metabolic limitations to photosynthesis under drought and salinity in C<sub>3</sub> plants. *Plant Biology* 6, 269-279.
- Flexas, J., Medrano, H., 2002. Drought-inhibition of photosynthesis in C<sub>3</sub> plants: stomatal and non-stomatal limitations revisited. *Annals of Botany* 89, 183-189.

- Flexas, J., Ribas-Carbó, M., Bota, J., Galmés, J., Henkle, M., Martínez-Cañellas, S., Medrano, H., 2006. Decreased Rubisco activity during water stress is not induced by decreased relative water content but related to conditions of low stomatal conductance and chloroplast CO<sub>2</sub> concentration. *New Phytologist* 172, 73–82.
- Foyer, C.H., Valadier, M.H., Migge, A., Becker, T.A., 1998. Drought-induced effects on nitrate reductase activity and mRNA and on the coordination of nitrogen and carbon metabolism in maize leaves. *Plant Physiology* 117, 283-292.
- Franco, A.C., Matsubara, S., Orthen, B., 2007. Photoinhibition, carotenoid composition and the co-regulation of photochemical and non-photochemical quenching in neotropical savanna trees. *Tree Physiology* 27, 717-725.
- Freschi, L., 2013. Nitric oxide and phytohormone interactions: current status and perspectives. *Frontiers in Plant Science* 4, 398-419.
- Fresneau, C., Ghashgaie, J., Cornic, G., 2007. Drought effect on nitrate reductase and sucrose-phosphate synthase activities in wheat (*Triticum durum* L.): role of leaf internal CO<sub>2</sub>. *Journal of Experimental Botany* 58, 2983-2992.
- Fukami, J., de la Osa, C., Ollero, F.J., Megías, M., Hungria, M., 2018b. Co-inoculation of maize with *Azospirillum brasilense* and *Rhizobium tropici* as a strategy to mitigate salinity stress. *Functional Plant Biology* 45, 328-339.
- Fukami, J., Ollero, F.J., de la Osa, C., Valderrama-Fernández, R., Nogueira, M.A., Megías, M., Hungria, M., 2018a. Antioxidant activity and induction of mechanisms of resistance to stresses related to the inoculation with *Azospirillum brasilense*. *Archives of Microbiology* 200, 1191-1203.
- Gan, L., Wu, X., Zhong, Y., 2015. Exogenously applied nitric oxide enhances the drought tolerance in Hulless barley. *Plant Production Science* 91, 52–56.
- Garg, B.K., Kathju, S., Burman, U., 2001. Influence of water stress on water relations, photosynthetic parameters and nitrogen metabolism of moth bean genotypes. *Biologia Plantarum* 44, 289-292.
- Gadelha, C.G., Miranda, R.S., Alencar, N.L.M., Costa, J.H., Prisco, J.T., Gomes-Filho, E., 2017. Exogenous nitric oxide improves salt tolerance during establishment of *Jatropha curcas* seedlings by ameliorating oxidative damage and toxic ion accumulation. *Journal of Plant Physiology* 212, 69–79.
- Groß, F., Durner, J., Gaupels, F., 2013. Nitric oxide, antioxidants and prooxidants in plant defence responses. *Frontiers in Plant Science* 4, 419-433.
- Grover, M., Madhubala, R., Ali, S.Z., Yadav, S.K., Venkatesvarlu, B. 2013. Influence of *Bacillus* spp. strains on seedling growth and physiological parameters of sorghum under moisture stress conditions. *Journal of Basic Microbiology* 54, 951-961.
- Hamanishi, E.T., Campbell, M.M., 2011. Genome-wide responses to drought in forest trees. *Forestry* 84, 273-283.
- Hayat, R., Ali, S., Amara, U., 2010. Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. *Annals of Microbiology* 60, 579–598.
- He, J.M., Xu, H., She, X.P., Song, X.G., Zhao, W.M., 2005. The role and the interrelationship of hydrogen peroxide and nitric oxide in the UV-B-induced stomatal closure in broad bean. *Functional Plant Biology* 32, 237–247.
- Hill, B.G., Dranka, B.P., Bailey, S.M., Lancaster, J.R.Jr., Darley-Usmar, V.M., 2010. What part of NO don't you understand. Some answers to the cardinal questions in nitric oxide biology. *Journal of Biological Chemistry* 285, 19699–19704.

- Hungria, M., Campo, R.J., Souza, E.M., Pedrosa, F.O., 2010. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. *Plant Soil* 331, 413-425.
- Idris, E.E., Iglesias, D.J., Talon, M., Borriss, R., 2007. Tryptophan-dependent production of indole-3-acetic acid (IAA) affects level of plant growth promotion by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Molecular Plant-microbe Interactions* 20, 619-626.
- IPCC, 2001. *Climate Change 2001: The Scientific Basis. Contribution of Working Group I to the Third Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change.* Houghton, J.T., Ding, Y., Griggs, D.J., Noguer, M., van der Linden, P.J., Dai, X., Maskell, K., Johnson, C.A. (Eds.). Cambridge University Press, Cambridge e Nova Iorque.
- Khairy, H., Oh, M.J., Lee, S.M., Kim, D.S., Roh, K.S., 2016. Nitric oxide overcomes Cd and Cu toxicity in in vitro-grown tobacco plants through increasing contents and activities of rubisco and rubisco activase. *Biochimie Open* 2, 41–51.
- Kong, X., Wang, T., Weijang, L., Tang, W., Zhang, D., Dong, H., 2016. Exogenous nitric oxide delays salt-induced leaf senescence in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Acta Physiologiae Plantarum* 38, 61-69.
- Kopyra, M., Gwózdź, 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 Physiology and Biochemistry* 41, 1011-1017.
- Kuzyakov, Y., Blagodatskaya, E., 2015. Microbial hotspots and hot moments in soil: concept and review. *Soil Biology and Biochemistry* 83, 184–199.
- Lal, R., 1996. Deforestation and land-use effects on soil degradation and rehabilitation in western Nigeria. I. Soil physical and hydrological properties. *Land Degradation & Development* 7, 19-45.
- Lambrecht, M., Okon, Y., Broek, A.V., Vanderleyden, J., 2000. Indole-3-acetic acid: a reciprocal signalling molecule in bacteria–plant interactions. *Trends in Microbiology* 8, 298-300.
- Lei, Y., Yin, C., Li, C., 2007. Adaptive responses of *Populus przewalskii* to drought stress and SNP application. *Acta Physiologiae Plantarum* 29, 519-526.
- Lendzian, K.J., 2006. Survival strategies of plants during secondary growth: barrier properties of phellements and lenticels towards water, oxygen, and carbon dioxide. *Journal of Experimental Botany* 57, 2535–2546.
- Li, Q., Niu, H., Yin, J., Wang, M., Shao, H., 2008. Protective role of exogenous nitric oxide against oxidative-stress induced by salt stress in barley (*Hordeum vulgare*). *Colloids and Surfaces, B. Biointerfaces* 65, 220–225.
- Liu, F., Xing, S., Ma, H., Du, Z., Ma, B., 2013. Cytokinin-producing, plant growth-promoting rhizobacteria that confer resistance to drought stress in *Platyclusus orientalis* container seedlings. *Applied Microbial and Cell Physiology* 97, 9155-9164.
- Locosselli, G.M., Krottenthaler, S., Pitsch, P., Anhof, D., Ceccantini, G., 2017. Age and growth rate of congeneric tree species (*Hymenaea* spp. - Leguminosae) inhabiting different tropical biomes. *Erdkunde* 71, 45-57.
- Lopes-Oliveira, P.J., Gomes, D.G., Pelegrino, M.T., Bianchini, E., Pimenta, J.A., Stolf-Moreira, R., Seabra, A.B., Oliveira, H.C., 2019. Effects of nitric oxide-releasing nanoparticles on neotropical tree seedlings submitted to acclimation under full sun in the nursery. *Scientific Reports* 9, 17371.
- Lorenzi, H., 2008. *Brazilian trees: identification and cultivation of tree plants in Brazil.* Plantarum, São Paulo.

- Lulai, E.C., Corsini, D.L., 1998. Differential deposition of suberin phenolic and aliphatic domains and their roles in resistance to infection during potato tuber (*Solanum tuberosum* L.) wound-healing. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 53, 209–222.
- Marulanda, A., Barea, J.M., Azcón, R., 2009. Stimulation of plant growth and drought tolerance by native microorganisms (AM fungi and bacteria) from dry environments: mechanisms related to bacterial effectiveness. *Journal of Plant Growth Regulation* 28, 115-124.
- 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. *Brazilian Journal of Botany* 39, 19-28.
- Mehnaz S, Lazarovits, G., 2006. Inoculation effects of *Pseudomonas putida*, *Gluconacetobacter azotocaptans* and *Azospirillum lipoferum* on corn plant growth under greenhouse conditions. *Microbial Ecology* 51, 326–335.
- Miller, G., Suzuki, N., Ciftci-Yilmaz, S., Mittler, R., 2010. Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. *Plant, Cell and Environment* 33, 453–467.
- Mittermeier, R.A., Gil, P.R., Hoffmann, M., Pilgrim, J., Brooks, T., Mittermeier, C.G., Lamoreux, J., Fonseca, G.A.B., 2004. In:\_\_\_\_\_ Hotspots revisited. Cemex, Cidade do México.
- Miyake, M., Sasaki, K., Ide, K., Matsukura, Y., Shijima, K., Fujiwara, D., 2006. Highly oligomeric procyanidins ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis via suppression of Th1 immunity. *The Journal of Immunology* 176, 5797-5804.
- Mohamed, H.I., Latif, H.H., Hanafy, R.S., 2016. Influence of nitric oxide application on some biochemical aspects, endogenous hormones, minerals and phenolic compounds of *Vicia faba* plant grown under arsenic stress. *Gesunde Pflanzen* 68, 99–107.
- Mokany, K., Raison, R.J., Prokushkin, A.S., 2006. Critical analysis of root : shoot ratios in terrestrial biomes. *Global Change Biology* 12, 84-96.
- Molina-Favero, C., Creus, C.M., Simontacchi, M., Puntarulo, S., Lamattina, L., 2008. Aerobic nitric oxide production by *Azospirillum brasilense* Sp245 and its influence on root architecture in tomato. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 21, 1001-1009.
- Mostofa, M.G., Seraj, Z.I., Fujita, M., 2014. Exogenous sodium nitroprusside and glutathione alleviate copper toxicity by reducing copper uptake and oxidative damage in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. *Protoplasma* 251, 1373–1386.
- Munné-Bosch, S., Alegre, L., 2004. Die and let live: leaf senescence contributes to plant survival under drought stress. *Functional Plant Biology* 31, 203-216.
- Nabi, R.B.S., Tayade, R., Hussain, A., Kulkarni, K.P., Imran, Q.M., Mun, B.G., Yun, B.W., 2019. Nitric oxide regulates plant responses to drought, salinity, and heavy metal stress. *Environmental and Experimental Botany* 161, 120-133.
- Neill, S., Barros, R., Bright, J., Desikan, R., Hancock, J., Harrison, J., Morris, P., Ribeiro, D., Wilson, I., 2008. Nitric oxide, stomatal closure, and abiotic stress. *Journal of Experimental Botany* 59, p. 165–176.
- Neto, H.F.P., 2013. Floral biology and breeding system of *Bauhinia forficata* (Leguminosae: Caesalpinioideae), a moth-pollinated tree in southeastern Brazil. *Brazilian Journal of Botany* 36, 55-64.
- Niu, L., Liao, W., 2016. Hydrogen peroxide signaling in plant development and abiotic responses: crosstalk with nitric oxide and calcium. *Frontiers in Plant Science* 7, 230.

- Noctor, G., Veljovic-Jovanovic, S., Driscoll, S., Novitskaya, L., Foyer, C.H., 2002. Drought and oxidative load in the leaves of C<sub>3</sub> plants: a predominant role for photorespiration? *Annals of Botany* 89, 841-850.
- Nyberg, G., Tobella, A.B., Kinyang, J., Ilstedt, U., 2012. Soil property changes over a 120-yr chronosequence from forest to agriculture in western Kenya. *Hydrology and Earth System Sciences* 16, 2085–2094.
- Oliveira, H.C., Gomes, B.C.R., Pelegrino, 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.
- Oliveira, H.C., da Silva, L.M.I., Freitas, L.D., Debiasi, T.V., Marchiori, N.M., Aidar, M.P.M., Bianchini, E., Pimenta, J.A., Stolf-Moreira, R., 2017 Nitrogen use strategies of seedlings from neotropical trees species of distinct successional groups. *Plant Physiology and Biochemistry* 114, 119–127.
- Osmond, C.B., Grace, S.C., 1995. Perspectives on photoinhibition and photorespiration in the field: quintessential inefficiencies of the light and dark reactions of photosynthesis? *Journal of Experimental Botany* 46, 1351-1362.
- Pallardy, S.G., 2008. Nitrogen Metabolism. In:\_\_\_\_\_ Physiology of woody plants. Academic Press, Cambridge, pp 233-253.
- Pan, Y.; Birdsey, R.A., Fang, J., Houghton, R., Kauppi, P.E., Kurz, W.A., Phillips, O.L., Shvidenko, A., Lewis, S.L., Canadell, J.G., Ciais, P., Jackson, R.B., Pacala, S.W., McGuire, A.D., Piao, S., Rautiainen, A., Sitch, S., Hayes, D., 2011. A large and persistent carbon sink in the World's Forests. *Science* 333, 1-7.
- Pandey, S., Ghosh, P.K., Ghosh, S., De, T.K., Maiti, T.K., 2013. Role of *Ochrobactrum* sp. and *Bacillus* spp. strains in bioremediation of a rice cultivar and their PGPR like activities. *Journal of Microbiology* 51, 11-17.
- Park, Y.G., Mun, B.G., Kang, S.M., Hussain, A., Shahzad, R., Seo, C.W., Kim, A.Y., Lee, S.U., Oh, K.Y., Lee, D.Y., Lee, I.J., Yun, B.W., 2017. *Bacillus aryabhatai* SRB02 tolerates oxidative and nitrosative stress and promotes the growth of soybean by modulating the production of phytohormones. *Plos One* 12, e0173203.
- Pepato, M.T., Keller, E.H., Baviera, A.M., Kettelhut, I.C., Vendramini, R.C., Brunetti, I.L., 2005. Anti-diabetic activity of *Bauhinia forficata* decoction in streptozotocin-diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology* 81, 191-197.
- Pérez-García, A., Romero, D., de Vicente, A., 2011. Plant protection and growth stimulation by microorganisms: biotechnological applications of Bacilli in agriculture. *Current Opinion in Biotechnology* 22, 187-193.
- Pizo, M.A., 1997. Seed dispersal and predation in two populations of *Cabralea canjerana* (Meliaceae) in the Atlantic Forest of southeastern Brazil. *Journal of Tropical Ecology* 13, 559-578.
- Poorter, H., Niklas, K.J., Reich, P.B., Oleksyn, J., Poot, P., Mommer, L., 2012. Biomass allocation to leaves, stems and roots: meta-analyses of interspecific variation and environmental control. *New Phytologist* 193, 30-50.
- Prakash, V., Singh, V.P., Tripathi, D.K., Sharma, S., Corpas, F.J., 2019. Crosstalk between nitric oxide (NO) and abscisic acid (ABA) signaling molecules in higher plants. *Environmental and Experimental Botany* 161, 41-49.
- Qiao, W., Li, C., Fan, L.M., 2014. Cross-talk between nitric oxide and hydrogen peroxide in plant responses to abiotic stresses. *Environmental and Experimental Botany* 100, 84-93.

- Ribeiro, M.C., Metzger, J.P., Martensen, A.C., Ponzoni, F.J., Hirota, M.M., 2009. The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. *Biological Conservation* 142, 1141-1153.
- Rincón, A., Valladares, F., Gimeno, T.E., Pueyo, J.J., 2008. Water stress responses of two Mediterranean tree species influenced by native soil microorganisms and inoculation with a plant growth promoting rhizobacterium. *Tree Physiology* 28, 1693-1701.
- Rodrigues, R.R., Lima, R.A.F., Gandolfi, S., Nave, A.G., 2009. On the restoration of high diversity forests: 30 years of experience in the Brazilian Atlantic Forest. *Biological Conservation* 142, 1242-1251.
- Rodríguez-Barrueco, C., Cervantes, E., Subbarao, N.S., Rodríguez-Caceres, E., 1991. Growth promoting effect of *Azospirillum brasilense* on *Casuarina cunninghamiana* Miq. seedlings. *Plant and Soil* 135, 121-124.
- Rodríguez, H., Fraga, R., 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances* 17, 319-339.
- Romero, A.M., Vega, D., Correa, O.S., 2014. *Azospirillum brasilense* mitigates water stress imposed by a vascular disease by increasing xylem vessel area and stem hydraulic conductivity in tomato. *Applied Soil Ecology* 82, 38-43.
- Rondina, A.B.L., Tonon, B.C., Lescano, L.E.A.M., Hungria, M., Nogueira, M.A., Zangaro, W., 2019. Plants of distinct successional stages have different strategies for nutrient acquisition in an Atlantic rain forest ecosystem. *International Journal of Plant Sciences* 180, 186-199.
- Rossetto, E.F., Vieira, A.O.S., 2013. Vascular flora of the Mata dos Godoy State Park, Londrina, Paraná, Brazil. *Check List* 9, 1020-1034.
- Rouphael, Y., Cardarelli, M., Schwarz, D., Franken, P., Colla, G., 2012. Effects of drought on nutrient uptake and assimilation in vegetable crops. In: Aroca R. (Eds.) *Plant responses to drought stress*. Springer, Berlin, pp 171-195.
- Rovedder, A.P.M., Piazza, E.M., Thomas, P.A., Felker, R.M., Hummel, R.B., Farias, J.A., 2016. Potential medicinal use of forest species of the Deciduous Seasonal Forest from Atlantic Forest Biome, South Brazil. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 59, e16150329.
- 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. *Brazilian Journal of Botany* 36, 89-98.
- Sánchez-Rodríguez, E., Rubio-Wilhelmi, M.D., Cervilla, L.M., Blasco, B., Rios, J.J., Leyva, R., Romero, L., Ruiz, J.M., 2010. Study of the ionome and uptake fluxes in cherry tomato plants under moderate water stress conditions. *Plant and Soil* 335, 339-347.
- Sandhya, V., Ali, S.Z., Grover, M., Reddy, G., Venkateswarlu, B., 2010. Effect of plant growth promoting *Pseudomonas* spp. on compatible solutes, antioxidant status and plant growth of maize under drought stress. *Plant Growth Regulation* 62, 21-30.
- Santisree, P., Adimulam, S.S., Sharma, K., Bhatnagar-Mathur, P., Sharma, K.K., 2019. Insights into the nitric oxide mediated stress tolerance in plants. In: Khan, M.I.R., Reddy, P.S., Ferrante, A., Khan, N.A. (Eds) *Plant Signaling Molecules*. Elsevier, Amsterdã, pp 385-406.
- Santos, R.F., da Cruz, S.P., Botelho, G.R., Flores, A.V., 2018. Inoculation of *Pinus taeda* Seedlings with plant growth-promoting rhizobacteria. *Floresta e Ambiente* 25, e20160056.

- Seabra, A.B., Rai, M., Durán, N., 2014. Nano carriers for nitric oxide delivery and its potential application in plant physiological process: A mini review. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology* 23, 1-10.
- Shahzad, R., Khan, A.L., Bilal, S., Waqas, M., Kang, S.M., Lee, I.J., 2017. Inoculation of abscisic acid-producing endophytic bacteria enhances salinity stress tolerance in *Oryza sativa*. *Environmental and Experimental Botany* 136, 68-77.
- Sherwood, S.C., Bony S., Dufresne J.L., 2014. Spread in model climate sensitivity traced to atmospheric convective mixing. *Nature* 505, 37-42.
- Shimamoto, C.Y., Botosso, P.C., Marques, M.C.M., 2014. How much carbon is sequestered during the restoration of tropical forests? Estimates from tree species in the Brazilian Atlantic forest. *Forest Ecology and Management* 329, 1-9.
- Shoo, L.P., Freebody, K., Kanowski, J., Catterall, C.P., 2015. Slow recovery of tropical old-field rainforest regrowth and the value and limitations of active restoration. *Conservation Biology* 30, 121-132.
- Silva, F.C., Soares-Silva, L.H., 2000. Arboreal Flora of the Godoy Forest State Park, Londrina, PR. Brazil. *Edinburgh Journal of Botany* 57, 107-120.
- Silveira, N.M., Frungillo, L., Marcos, F.C.C., Pelegrino, M.T., Miranda, M.T., Seabra, A.B., Salgado, I., Machado, E.C., Ribeiro, R.V., 2016. Exogenous nitric oxide improves sugarcane growth and photosynthesis under water deficit. *Planta* 244, 181-190.
- Smirnov, N., 1993. The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. *New Phytologist* 125, 27-58.
- Solomonson, L.P., Barber, M.J., 1990. Assimilatory nitrate reductase: functional properties and regulation. *Annual Reviews* 41, 225-253.
- Souza, G.M., Sato, A.M., Ribeiro, R.V., Prado, C.H.B.A., 2010. Photosynthetic responses of four tropical tree species grown under gap and understory conditions in a semi-deciduous forest. *Revista Brasileira de Botânica* 33, 529-538.
- Souza, N.L., Rocha, S.S., Narezzi, N.T., Tiepo, A.N., Oliveira, A.L.M., Oliveira, H.C., Bianchini, E., Pimenta, J.A., Stolf-Moreira, R., 2020. Differential impacts of plant growth-promoting bacteria (PGPB) on seeds of Neotropical tree species with contrasting tolerance to shade. *Trees* 34, 121-132.
- Souza, R.P., Válio, I.F.M., 1999. Carbon translocation as affected by shade in saplings of shade tolerant and intolerant species. *Biologia Plantarum* 42, 631-636.
- Sperry, J.S., Hacke, U.G., Oren, R., Comstock, J.P., 2002. Water deficits and hydraulic limits to leaf water supply. *Plant, Cell and Environment* 25, 251-263.
- Stamler, J.S., Singel, D.J., Loscalzo, J., 1992. Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science* 258, 1898-1902.
- Szabados, L., Savouré, A., 2010. Proline: a multifunctional amino acid. *Trends in Plant Science* 15, 89-97.
- Terrile, M.C., París, R., Calderón-Villalobos, L.I.A., Iglesias, M.J., Lamattina, L., Estelle, M., Casalougué, C.A., 2012. Nitric oxide influences auxin signaling through S-nitrosylation of the *Arabidopsis* TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1 auxin receptor. *The Plant Journal* 70, 492-500.
- Tiepo, A.N., Hertel, M.F., Rocha, S.S., Calzavara, A.K., Oliveira, A.L.M., Pimenta, J.A., Oliveira, H.C., Bianchini, E., Stolf-Moreira, R., 2018. Enhanced drought tolerance in seedlings of Neotropical tree species inoculated with plant growth-promoting bacteria. *Plant Physiology and Biochemistry* 130, 277-288.

- Tiepo, A.N., Constantino, L.V., Madeira, T.B., Gonçalves, L.S.A., Pimenta, J.A., Bianchini, E., Oliveira, A.L.M., Oliveira, H.C., Stolf-Moreira, R., 2020. Plant growth-promoting bacteria improve leaf antioxidant metabolism of drought-stressed Neotropical trees. *Planta* 251, 83
- Tomás, M., Flexas, J., Copolovici, L., Galmés, J., Hallik, L., Medrano, H., Ribas-Carbó, M., Tosens, T., Vislap, V., Niinemets, Ü., 2013. Importance of leaf anatomy in determining mesophyll diffusion conductance to CO<sub>2</sub> across species: quantitative limitations and scaling up by models. *Journal of Experimental Botany* 64, 2269-2281.
- Trenberth, K.E., Dai, A., van der Schrier, G., Jones, P.D., Barichivich, J., Briffa, K.R., Sheffield, J., 2014. Global warming and changes in drought. *Nature Climate Change* 4, 17-22.
- van der Werf, G.R., Morton, D.C., DeFries, R.S., Olivier, J.G.J., Kasibhatla, P.S., Jackson, R.B., Collatz, G.J., Randerson, J.T., 2009. CO<sub>2</sub> emissions from forest loss. *Nature Geoscience* 2, 737-738.
- Vardharajula, S., Ali, S.Z., Grover, M., Reddy, G., Bandi, V., 2011. Drought-tolerant plant growth promoting *Bacillus* spp.: effect on growth, osmolytes and antioxidant status of maize under drought stress. *Journal of Plant Interactions* 6, 1-14.
- Vicente, R.F., 2006. O Parque Estadual Mata dos Godoy. In: Torezan, J.M.D. (org.). *Ecologia do Parque Estadual Mata dos Godoy*. ITEDES, Londrina, pp. 13-18.
- Voss, I., Sunil, B., Scheibe, R., Raghavendra, A.S., 2013. Emerging concept for the role of photorespiration as an important part of abiotic stress response. *Plant Biology* 15, 713-722.
- Wang, C.J., Yang, W., Wang, C., Gu, C., Niu, D.D., Liu, H.X., Wang, Y.P., Guo, J.H., 2012. Induction of Drought Tolerance in Cucumber Plants by a Consortium of Three Plant Growth-Promoting Rhizobacterium Strains. *Plos One* 7, e52565.
- Wilkinson, S., Davies, W.J., 2010. Drought, ozone, ABA and ethylene: new insights from cell to plant to community. *Plant, Cell and Environment* 33, 510-525.
- Wunderling, A., Ripper, D., Barra-Jimenez, A., Mahn, S., Sajak, K., Targem, M.B., Ragni, L., 2018. A molecular framework to study periderm formation in *Arabidopsis*. *New Phytologist* 219, 216-229.
- Zaady, E., Perevolotsky, A., 1995. Enhancement of growth and establishment of oak seedlings (*Quercus ithaburensis* Decaisne) by inoculation with *Azospirillum brasilense*. *Forest Ecology and Management* 72, 81-83.
- Zama, M.Y., Bovolenta, Y.R., Carvalho, E.S., Rodrigues, D.R., Araujo, C.G., Sorace, M.A.F., Luz, D.G., 2012. Florística e síndromes de dispersão de espécies arbustivo-arbóreas no Parque Estadual Mata São Francisco, PR, Brasil. *Hoehnea* 39, 369-378.
- Zhang, W., Xie, Z., Zhang, X., Lang, D., Zhang, X., 2019. Growth-promoting bacteria alleviates drought stress of *G. uralensis* through improving photosynthesis characteristics and water status. *Journal of Plant Interactions* 14, 580-589.

## 1 CAPÍTULO 1

### **Bactérias associativas aumentam a tolerância ao déficit hídrico de duas espécies arbóreas de Fabaceae da Mata Atlântica**

Mariana Fernandes Hertel<sup>a,\*</sup>, José Antonio Pimenta<sup>a</sup>, Renata Stolf Moreira<sup>a</sup>

<sup>a</sup>*Departamento de Biologia Animal e Vegetal, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brasil*

*\*Autor Correspondente: Departamento de Biologia Animal e Vegetal, Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid Km 380, Londrina, PR, 86057-970, Brasil*

*Email: [mariana.f.h@hotmail.com](mailto:mariana.f.h@hotmail.com)*

Artigo a ser submetido para publicação na revista *Environmental and Experimental Botany*.

Fator de impacto: 3,712.

<https://www.journals.elsevier.com/environmental-and-experimental-botany>

#### *Destaques*

- Mudanças de *Hymenaea courbaril* inoculadas com *Bacillus velezensis* tiveram menor queda do potencial hídrico das folhas e maior concentração de proteínas foliares solúveis
- A inoculação com *B. velezensis* e *Azospirillum brasilense* aumentou a concentração foliar de prolina das mudas de *H. courbaril*
- Mudanças de *Bauhinia forficata* inoculadas com *A. brasilense* mantiveram a assimilação líquida de CO<sub>2</sub> em déficit hídrico, e esta bactéria diminuiu a peroxidação lipídica nas folhas
- Ambas as estirpes bacterianas tiveram impacto positivo na assimilação de nitrato nas duas espécies

#### *Abreviações*

Ab-V5, estirpe Ab-V5 de *Azospirillum brasilense*; ACV, área do cilindro vascular; AF: área foliar total;  $A_{max}$ , assimilação líquida de CO<sub>2</sub>; ANR, atividade da redutase do nitrato; BAs, bactérias associativas; CC: capacidade de campo;  $C_i/C_a$ : razão da concentração intercelular de CO<sub>2</sub> pela concentração ambiente; DH, déficit hídrico; EEAB, espessura da epiderme da face abaxial; EEAD, espessura da epiderme da face adaxial; EC, espessura do córtex; ECV, espessura do cilindro vascular; EF, espessura do floema secundário; EL, espessura do limbo; EP, espessura da periderme; EPP, espessura do parênquima paliçádico; ER, espessura da raiz; *EUA*, eficiência no uso da água; EX, espessura do xilema secundário; FEV, frequência de elementos de vaso; FMF, fração da massa foliar; FMR, fração da massa da raiz;  $g_s$ , condutância estomática;  $k$ , eficiência instantânea de carboxilação; MDA,

malondialdeído; MPa, mega Pascal; MS, massa seca; NIn, mudas não inoculadas com bactérias associativas; PA, parte aérea; RAF, razão da área foliar; UG, umidade gravimétrica; ZK, *Bacillus velezensis*.

## RESUMO

As florestas são essenciais para manutenção do regime hídrico global e sequestro de carbono. O plantio ativo de mudas é uma estratégia para recuperação de áreas degradadas que tem como um dos principais fatores limitantes o déficit hídrico (DH). A inoculação com bactérias associativas pode aumentar a tolerância de plantas ao DH e é uma ferramenta promissora para o cultivo de mudas arbóreas neotropicais destinadas a reflorestamentos. O objetivo deste estudo foi verificar se a inoculação com uma das bactérias associativas, *Azospirillum brasilense* (Ab-V5) e *Bacillus velezensis* (ZK), aumenta a tolerância ao DH de mudas de *Hymenaea courbaril* L. (*H.c.*) e *Bauhinia forficata* Link (*B.f.*). As mudas não inoculadas (NIn), inoculadas com Ab-V5 ou com ZK foram submetidas à restrição hídrica no solo por 30 dias em casa de vegetação. As mudas de *H.c.* inoculadas com ZK tiveram aumento da eficiência no uso da água e do  $\Psi_w$  em DH quando comparadas às mudas em DH NIn, além de maior concentração de proteínas solúveis foliares. Tanto as mudas inoculadas com ZK quanto com Ab-V5 tiveram maior acúmulo de prolina e maior espessura da periderme das raízes. As mudas de *H.c.* com Ab-V5 em DH tiveram maior ANR nas folhas que as NIn em DH. As mudas de *B.f.* com Ab-V5 mantiveram a assimilação de CO<sub>2</sub> em DH e tiveram redução da peroxidação lipídica. Ambas as estirpes estimularam a manutenção da ANR nas raízes das mudas de *B.f.* e a eficiência instantânea de carboxilação em DH. Os resultados indicam que a inoculação com bactérias induziu maior tolerância ao DH nas mudas de ambas as espécies, demonstrando a importância da inoculação com bactérias associativas em espécies arbóreas neotropicais desta importante família (Fabaceae) destinadas a programas de reflorestamento.

**Palavras-chave:** *Azospirillum brasilense*, *Bacillus velezensis*, espécies arbóreas neotropicais, trocas gasosas, estresse abiótico, leguminosas

## ABSTRACT

Forests are essential to maintain the global hydrological cycle, and drought is a main limiting factor to active planting when recovering degraded sites. The inoculation with associative bacteria can increase tolerance to drought, and it is a promising tool to use when growing Neotropical seedlings destined to reforestation. Our goal was to verify if inoculation with one bacteria, *Azospirillum brasilense* or *Bacillus velezensis*, enhances drought tolerance of seedlings of two tree species, *Hymenaea courbaril* L. (H.c.), and *Bauhinia forficata* Link (B.f.). Non-inoculated seedlings (Nin), seedlings with Ab-V5, and with ZK were kept in soil with water restriction for 30 days in a greenhouse. H.c. seedlings with ZK under drought showed higher water use efficiency and leaf  $\Psi_w$  than Nin seedlings. Also, ZK increased the contents of soluble proteins in leaves. Both strains increased proline content and periderm thickness of H.c. The drought-stressed seedlings with Ab-V5 had higher NRA than the Nin ones. Ab-V5 stimulated the maintenance of photosynthesis and decreased leaf lipid peroxidation of stressed B.f. Both strains were able to maintain root NRA and carboxylation efficiency in B.f. seedlings. The results show higher tolerance to drought conferred by the associative bacteria by different mechanisms in seedlings of both plant species, highlighting the importance of inoculation for those Neotropical tree species belonging to the family Fabaceae.

**Key words:** *Azospirillum brasilense*, *Bacillus velezensis*, Neotropical tree species, gas exchange, abiotic stress, legumes

## 1.1 INTRODUÇÃO

Diante das mudanças climáticas que ocorrem em escala global e podem levar a eventos de seca mais intensos (Trenberth *et al.*, 2013), as florestas são essenciais para manutenção do regime hídrico global (Ellison *et al.*, 2017). Além disso, a preservação de habitats florestais e a restauração ativa de ambientes degradados são primordiais para o sequestro do CO<sub>2</sub> atmosférico, contribuindo para a diminuição do aquecimento global e manutenção da biodiversidade (Cunningham *et al.*, 2015).

Modelos climáticos estimam que espécies representativas da Mata Atlântica podem ter sua área de distribuição reduzida em até 50% com o aumento do CO<sub>2</sub> atmosférico e da temperatura (Colombo e Joly, 2010), portanto o plantio de mudas nativas deste bioma é de extrema importância. Entretanto, para que o reflorestamento tenha sucesso é preciso que as mudas sobrevivam e cresçam em condições estressantes como alta luminosidade e déficit hídrico (DH) no solo (Craven *et al.*, 2011).

Bactérias associativas ou bactérias promotoras do crescimento em plantas (BPCPs) são ferramentas que podem aumentar a tolerância das plantas a estresses abióticos, e têm sido amplamente utilizadas em inoculações de diversas espécies submetidas a estresses como salino, intoxicação por metais pesados, e déficit hídrico (Belimov *et al.*, 2004; Fukami *et al.*, 2018a; 2018b; Tiepo *et al.*, 2018). Bactérias dos gêneros *Azospirillum* e *Bacillus* são amplamente empregadas em inoculações com efeitos benéficos a plantas cultivadas que vão desde a solubilização de nutrientes até a produção de hormônios (revisado por Radhakrishnan *et al.*, 2017; Fukami *et al.*, 2018a). Plantas em déficit hídrico inoculadas com bactérias associativas apresentam aumento da resposta antioxidante, maior potencial hídrico e conteúdo relativo de água, aumento de pigmentos fotossintéticos, aumento de prolina, e maior crescimento (Sandhya *et al.*, 2010; Vardharajula *et al.*, 2011; Grover *et al.*, 2013; Cohen *et al.*, 2015).

Entretanto, poucos estudos com mudas de espécies nativas de um bioma utilizam bactérias associativas como ferramentas para aumentar a tolerância destas mudas a estresses (Rincón *et al.*, 2008; Estes *et al.*, 2004; Bashan *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2013; Armada *et al.*, 2018). Tiepo *et al.* (2018) realizaram um estudo com mudas de duas espécies arbóreas neotropicais da Mata Atlântica submetidas ao DH e inoculadas com quatro estirpes bacterianas. Dentre as estirpes utilizadas,

*Azospirillum brasilense* (Ab-V5) aumentou a fotossíntese líquida de mudas de *Cariniana estrellensis* (Raddi) Kuntze em DH, e *Bacillus* sp. diminuiu a peroxidação lipídica nas folhas de mudas de *Trema micrantha* (L.) Blume em DH (Tiepo *et al.*, 2018), demonstrando o potencial que a inoculação possui no aumento da tolerância ao DH de mudas arbóreas neotropicais.

Espécies da família Fabaceae (Leguminosae) são comumente utilizadas em programas de reflorestamento de áreas de Mata Atlântica, pois esta é uma das 10 famílias com maior riqueza de espécies do bioma, com 945 espécies, das quais 42% são endêmicas (Lima *et al.*, 2009). *Hymenaea courbaril* L. e *Bauhinia forficata* Link são leguminosas nativas da Mata Atlântica com propriedades medicinais (Miyake *et al.*, 2006; Pepato *et al.*, 2005; Bezerra *et al.*, 2013) amplamente empregadas em áreas de reflorestamento ativo. *H. courbaril* é uma leguminosa não-nodulante (Faria e Lima, 1998) e, Silva *et al.* (2018) verificaram ausência de nodulação em mudas de *B. forficata* em vasos com diferentes substratos em casa de vegetação. Ainda, considerando que a fixação biológica de nitrogênio é ligada a filogenia destas espécies (Reis e Teixeira, 2005), Frioni *et al.* (1998) verificaram ausência de nodulação em *B. forficata* subespécie *pruinosa* (J. Vogel) Fortunato e Wunderlin, e a ausência de nodulação é registrada para outras espécies do gênero (Moreira *et al.*, 1992; Faria e Lima, 1998; Diabate *et al.*, 2005).

Reflorestamentos com plantio de mudas com potencial comercial e farmacológico auxiliam tanto no interesse dos proprietários na recuperação de suas áreas degradadas como possibilitam o aproveitamento dos recursos naturais destas plantas (Chazdon e Coe, 1999) e a inoculação com bactérias associativas pode aumentar o crescimento destas leguminosas não-nodulantes (Bashan *et al.*, 2012).

Considerando que o DH é um estresse abiótico importante em ambientes a serem restaurados e que a inoculação com bactérias associativas pode aumentar o sucesso do plantio, o objetivo do presente estudo foi verificar se a inoculação com bactérias associativas aumenta a tolerância ao déficit hídrico de mudas de *B. forficata* e *H. courbaril*. Para isto mudas destas espécies foram mantidas sob restrição hídrica e inoculadas com *Azospirillum brasilense* (Ab-V5) ou *Bacillus velezensis* (ZK) em casa de vegetação. A hipótese é que as mudas de *B. forficata* e *H. courbaril* inoculadas com as bactérias associativas terão seu metabolismo, crescimento e anatomia modificados de modo a proporcionar maior tolerância ao déficit hídrico.

## 1.2 METODOLOGIA

### 1.2.1 Delineamento Experimental

Sementes maduras de *Bauhinia forficata* (pata-de-vaca ou unha-de-vaca; tolerante à sombra, ocupa o subosque; Silva e Soares-Silva, 2000) e *Hymenaea courbaril* (jatobá; tolerante à sombra, atinge o dossel; Asquith *et al.*, 1999; Locosselli *et al.*, 2017) foram coletadas a partir de diferentes árvores, em regiões de fragmentos de Floresta Estacional Semidecidual e arredores do município de Londrina e semeadas em areia em casa de vegetação. Após a semeadura, para os tratamentos com bactérias associativas, a areia foi regada com 0,2 L de suspensão de células bacterianas em água destilada a  $10^6$  células mL<sup>-1</sup> por 1 L de areia, sendo uma bandeja regada com *Bacillus velezensis* (ZK) e outra com *Azospirillum brasilense* (estirpe Ab-V5).

As bactérias utilizadas são parte da Coleção de Bactérias Promotoras do Crescimento em Plantas da Universidade Estadual de Londrina (UEL). *B. velezensis* (Ruiz-García *et al.*, 2005; Dunlap *et al.*, 2016) foi caracterizada como BPCP por Goes *et al.* (2012), e *Azospirillum brasilense* (diazotrófica, estirpe Ab-V5) é registrada no Ministério da Agricultura para uso em inoculantes comerciais (Hungria *et al.*, 2010). Os inóculos foram preparados de acordo com Oliveira *et al.* (2017).

Após expandir um par de folhas, as plântulas foram transferidas para sacos (2 L, 15 cm de altura e 13 cm de diâmetro) contendo substrato com areia e solo argiloso (1:1). Foi transplantada apenas uma planta por saco. As mudas de *H. courbaril* foram transplantadas um mês após a semeadura e as mudas de *B. forficata* após 44 dias. As plântulas selecionadas para o transplântio apresentavam uniformidade de tamanho e aparência, tanto dentro de um tratamento, quanto entre tratamentos (não inoculadas, com ZK e com Ab-V5). No transplântio, cada saco foi regado com 30 mL de suspensão de inóculos a  $10^6$  cél. mL<sup>-1</sup> diluída em água destilada. As mudas permaneceram em período de aclimação e crescimento até o desenvolvimento de pelo menos três pares de folhas totalmente expandidas. Este período foi de 42 dias para as mudas de *H. courbaril* e dois meses para as mudas de *B. forficata*. Durante este período, os sacos das plântulas foram regados com 15 mL de solução nutritiva de Hoagland uma vez por mês.

O déficit hídrico moderado (DH, 16% de umidade gravimétrica, UG,

previamente determinada) foi aplicado após o período de aclimação e crescimento. Metade das mudas (45 plantas) foi submetida ao déficit hídrico, com suspensão da rega até atingir a primeira murcha, e a outra foi mantida em solo na capacidade de campo (CC, 27% de UG previamente determinada) durante 30 dias. A manutenção do DH foi feita com regas limitadas de acordo com o grau de murcha das folhas e da textura e aparência do solo, de modo a manter as plantas com restrição hídrica evitando risco de morte. Como critério para evitar este risco controlou-se a flacidez das folhas e a turgescência do pecíolo. O monitoramento e a rega das mudas eram feitos no máximo a cada dois dias, sendo que em semanas quentes, com temperatura próxima de 30°C, o monitoramento era diário.

O experimento conduzido em casa de vegetação com as mudas de *H. courbaril* ocorreu de abril a maio de 2016 e com as mudas de *B. forficata* de maio a junho de 2016. Segundo dados do IAPAR (2016) para o mês de abril de 2016 a temperatura mínima foi de 18,2°C e a máxima 30,7°C; em maio a mínima foi 14,4°C e a máxima 22,2°C, e em junho a temperatura mínima foi de 11°C e a máxima 21,4°C. Para manutenção da temperatura da casa de vegetação próxima dos 25°C durante os meses de outono e início de inverno, as paredes laterais plásticas eram fechadas durante os momentos mais frios do dia, do fim da tarde até às 12h do dia seguinte. A radiação fotossinteticamente ativa ao meio-dia era de aproximadamente 500  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  dentro da casa de vegetação.

### 1.2.2 Trocas Gasosas

Foram avaliadas a assimilação líquida de  $\text{CO}_2$  ( $A_{\text{max}}$ ,  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), a condutância estomática ( $g_s$ ,  $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), a transpiração ( $E$ ,  $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), e a concentração intercelular de  $\text{CO}_2$  ( $C_i$ ,  $\mu\text{mol mol}^{-1}$ ). As medidas foram realizadas utilizando um analisador de gás por infravermelho (IRGA) portátil modelo LICOR 6400 XT (*LI-COR Biosciences*, Lincoln, EUA) conectado a uma câmara de 6  $\text{cm}^2$  sob radiação fotossinteticamente ativa saturante de 1900  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e fluxo de 380  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Foram calculadas a eficiência no uso da água ( $EUA$ :  $A_{\text{max}}/E$ ,  $\mu\text{mol mmol}^{-1}$ ), a razão entre a  $C_i$  e a concentração de  $\text{CO}_2$  no ambiente ( $C_i/C_a$ ) e a eficiência instantânea de carboxilação ( $k$ ;  $A_{\text{max}}/C_i$ ,  $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). As medidas foram feitas ao final de 30 dias de restrição hídrica entre às 8h e 11 horas, em dias ensolarados. A 3ª ou 4ª folha, ou folíolo (no caso de mudas de *H. courbaril*), do ápice

para a base completamente expandida de cada muda foi utilizada.

### 1.2.3. Potencial Hídrico

Folhas e folíolos com o pecíolo das mudas de cada tratamento foram coletados para verificar o potencial hídrico ( $\Psi_w$ ; MPa) utilizando uma câmara de pressão do tipo Scholander (Scholander *et al.*, 1965). As folhas das mudas foram cortadas no momento da medida que ocorreu das 8h às 10h em dias com baixa umidade do ar.

### 1.2.4. Análises Bioquímicas

A concentração de prolina foi determinada a partir de 100 mg de massa fresca de folhas maceradas com  $N_2$  líquido, homogeneizadas com etanol 70% e centrifugadas a 10.000 x g por 10 minutos. O extrato foi submetido à reação com níhidrina 1% em ácido acético a 60% adicionado de etanol a 20% na solução em banho-maria a 96°C por 20 minutos (modificado de Karajila e Selović, 2018). A concentração de prolina foi determinada a 520 nm (Carillo *et al.*, 2008) utilizando o leitor de microplacas *SpectraMax Plus 384* (Molecular Devices, Sunnyvale, EUA).

Como estimativa da peroxidação lipídica, foi verificada a concentração de malondialdeído (MDA) utilizando 100 mg de massa fresca de folha maceradas com  $N_2$  líquido e homogeneizadas com ácido tricloroacético a 0,2% em metanol. O conteúdo de MDA foi determinado pelo ensaio TBARS com medidas de fluorescência (ex/em: 535/590 nm) (Camejo *et al.*, 1998) utilizando o leitor de microplacas *Victor TM 3* (Perkin Elmer, Turku, Finlândia).

Com o mesmo extrato utilizado para o ensaio TBARS, após centrifugação a 10.000 x g por 5 minutos a 4°C foi determinado o conteúdo de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) após reação em gelo com tampão fosfato de potássio 0,1 M (pH 7,5) e KI 1 M. A determinação foi feita a 390 nm utilizando o leitor de microplacas *Victor TM 3* (Perkin Elmer, Turku, Finlândia).

Para determinação da atividade da redutase do nitrato (ANR) *in vivo* 150 mg da primeira folha completamente expandida e 150 mg de raízes finas foram coletados seguindo a metodologia de Stewart *et al.* (1986). Os tecidos foram cortados em pedaços menores e infiltrados a vácuo com 5 mL de solução tampão

( $K_2HPO_4$  0,05 M, pH 7,5;  $KNO_3$  0,05 M, e 1% propanol). As amostras foram incubadas por 40 min no escuro, a temperatura ambiente. O nitrito liberado em solução foi determinado espectrofotometricamente a 540 nm após reação com sulfanilamida 1% em HCl 1,5 N e 0,02% de cloreto de *N*-naftil-etilenodiamina (NEED) em água.

Para extração de metabólitos e moléculas relacionados ao metabolismo do nitrogênio, 200 mg de folha e de raízes finas frescas foram coletados e macerados em  $N_2$  líquido, em seguida a extração dos compostos de baixo peso molecular ( $NO_3^-$ ,  $NH_4^+$  e aminoácidos) foi feita com solução de metanol:clorofórmio:água (12:5:3, v:v:v, MCW) de acordo com o procedimento descrito por Oliveira e Sodek (2013). As proteínas foram extraídas do precipitado da extração com MCW utilizando tampão NaOH 0,1 M. A determinação da concentração de  $NO_3^-$  foi feita após redução por  $VCl_3$  (0,4% em HCl 0,5 M) e a dosagem do  $NO_2^-$  resultante foi feita utilizando o reagente de Griess (sulfanilamida 1% em HCl 1,5 N, e NEED 0,02%), e a absorbância foi lida espectrofotometricamente a 540 nm (Miranda *et al.*, 2001). A concentração de  $NH_4^+$  foi determinada pela reação de Berthelot usando o reagente 1 (Fenol 1% e Nitroprussiato de Sódio 0,2 mM) e o reagente 2 (NaOH 125 mM,  $Na_2HPO_4$  150 mM, e NaClO 0,12%), após 35 minutos a 37°C e a absorbância a 625 nm foi determinada (McCullough, 1967). Os aminoácidos livres totais foram quantificados com o ensaio de nihidrina (Yemm e Cocking, 1955). Uma mistura de 250 mL de amostra diluída, 125 mL de tampão citrato 0,2 M (pH 5,0), 50 mL de nihidrina 5% (em metilcelusolve) e 250 mL de KCN 10 mM (em metilcelusolve) foi mantida a 100°C por 20 min. Após diluição com etanol 60%, a absorbância a 570 nm foi medida e comparada com uma curva padrão de leucina. A concentração de proteínas foi determinada usando o reagente Bio-Rad Coomassie Brilliant Blue G-250 (Bradford, 1976), seguindo as instruções do fabricante.

#### 1.2.5. Biometria

A área foliar total ( $cm^2$ ) das folhas completamente expandidas foi medida utilizando o medidor de área foliar modelo LI-3000CAP acoplado à esteira LI-3050C (LI-COR Biosciences, Lincoln, EUA). Folhas com aspecto amarelado, indicativo de senescência, não foram incluídas. As folhas, o caule e a raiz foram colocados em estufa a 60°C até atingirem massa constante para aferir a massa seca (g). Foram

calculadas a fração da massa foliar (FMF: massa seca da folha/massa seca da planta), a razão da área foliar (RAF: área foliar/massa seca da planta;  $\text{cm}^2 \text{g}^{-1}$ ), a fração da massa da raiz (FMR: massa seca da raiz/massa seca da planta) e a razão da massa da raiz pela massa da parte aérea (R/PA).

#### 1.2.6. Anatomia

As avaliações anatômicas foram feitas apenas nas mudas mantidas em solo na CC, pois não houve expansão foliar no período de 30 dias de DH, e para padronização dos dados anatômicos de folhas e raízes, apenas as mudas sem estresse foram avaliadas. Utilizando três plantas, segmentos de 0,5  $\text{cm}^2$  da região mediana da terceira folha/folíolo a partir do ápice foram coletadas e fixadas em FAA<sub>50%</sub> (formaldeído:ácido acético:álcool). Das raízes de três mudas de *H. courbaril* e de quatro mudas de *B. forficata*, segmentos a partir de 1 cm do ápice radicial foram fixados em FAA<sub>50%</sub>. Os segmentos das folhas e raízes foram desidratados em série etílica crescente e incluídos em historesina Leica. Foram realizados cortes transversais de 7 micrômetros de espessura em micrótomo rotativo de avanço automático (LEICA RM 2255) e os cortes foram corados com azul de toluidina. As lâminas foram montadas em Permount.

Para as avaliações micromorfométricas dos tecidos foliares, foram feitas duas lâminas para cada folha/folíolo (amostra), das quais foram selecionados dois cortes. Os cortes foram fotografados em fotomicroscópio com câmera digital acoplado e realizados, em cada corte, três medidas, totalizando seis medidas por amostra. Das folhas, foram medidas para ambas as espécies, a espessura da epiderme da face adaxial (EEAD,  $\mu\text{m}$ ), a espessura da epiderme da face abaxial (EEAB,  $\mu\text{m}$ ), a espessura do limbo (EL,  $\mu\text{m}$ ) e a espessura do mesofilo (EM,  $\mu\text{m}$ ). Para *H. courbaril* foram medidos a espessura do parênquima paliçádico (EPP,  $\mu\text{m}$ ), e a espessura do parênquima esponjoso (EPE,  $\mu\text{m}$ ) com o software Image-Pro Plus (Media Cybernetics, Inc.).

Para as avaliações micromorfométricas das raízes de ambas as espécies foram medidas a espessura da periderme (EP,  $\mu\text{m}$ ), a espessura total da raiz (ER,  $\mu\text{m}$ ) e a área do cilindro vascular (ACV,  $\text{mm}^2$ ). Apenas para *B. forficata* foram medidas a espessura do xilema secundário (EX,  $\mu\text{m}$ ), a espessura do floema secundário (EF,  $\mu\text{m}$ ), e foi verificada a frequência dos elementos de vaso do

xilema por ACV ( $n^{\circ}$   $\text{mm}^{-2}$ ). As mudas de *H. courbaril* estavam em início de crescimento secundário, assim, foram medidas também a espessura do córtex (EC,  $\mu\text{m}$ ) e a espessura do cilindro vascular ( $\mu\text{m}$ ), utilizando o software Image-Pro Plus (Media Cybernetics, Inc.).

### 1.2.7. Análise Estatística

O experimento teve delineamento inteiramente ao acaso, sendo os tratamentos NIn CC (controle, mudas não inoculadas em solo na capacidade de campo), ZK CC (mudas inoculadas com *Bacillus velezensis* em solo na CC), Ab-V5 CC (mudas inoculadas com *Azospirillum brasilense* em solo na CC), NIn DH (mudas não inoculadas em DH), ZK DH (mudas inoculadas com *B. velezensis* em DH), e Ab-V5 DH (mudas inoculadas com *A. brasilense* em DH). Após verificação da normalidade (Shapiro-Wilk) e homocedasticidade (Levene) dos dados, estes foram submetidos à comparação por contrastes ortogonais previamente estabelecidos. A comparação entre os grupos de médias foi feita pelo teste F com nível de significância de 5% utilizando o programa *Statistica* versão 12.0 (*StatSoft*, Tulsa, EUA). As tabelas referentes aos contrastes e respectivos valores calculados de F e de p estão como apêndices.

Os dados referentes à anatomia das folhas e das raízes tiveram apenas um fator, inoculação (NIn, ZK e Ab-V5), e foram comparados pela Anova de um fator seguida por teste de Fisher DMS ( $\alpha = 5\%$ ) utilizando o programa *Statistica* versão 12.0.

## 1.3. RESULTADOS

### 1.3.1. *Hymenaea courbaril*

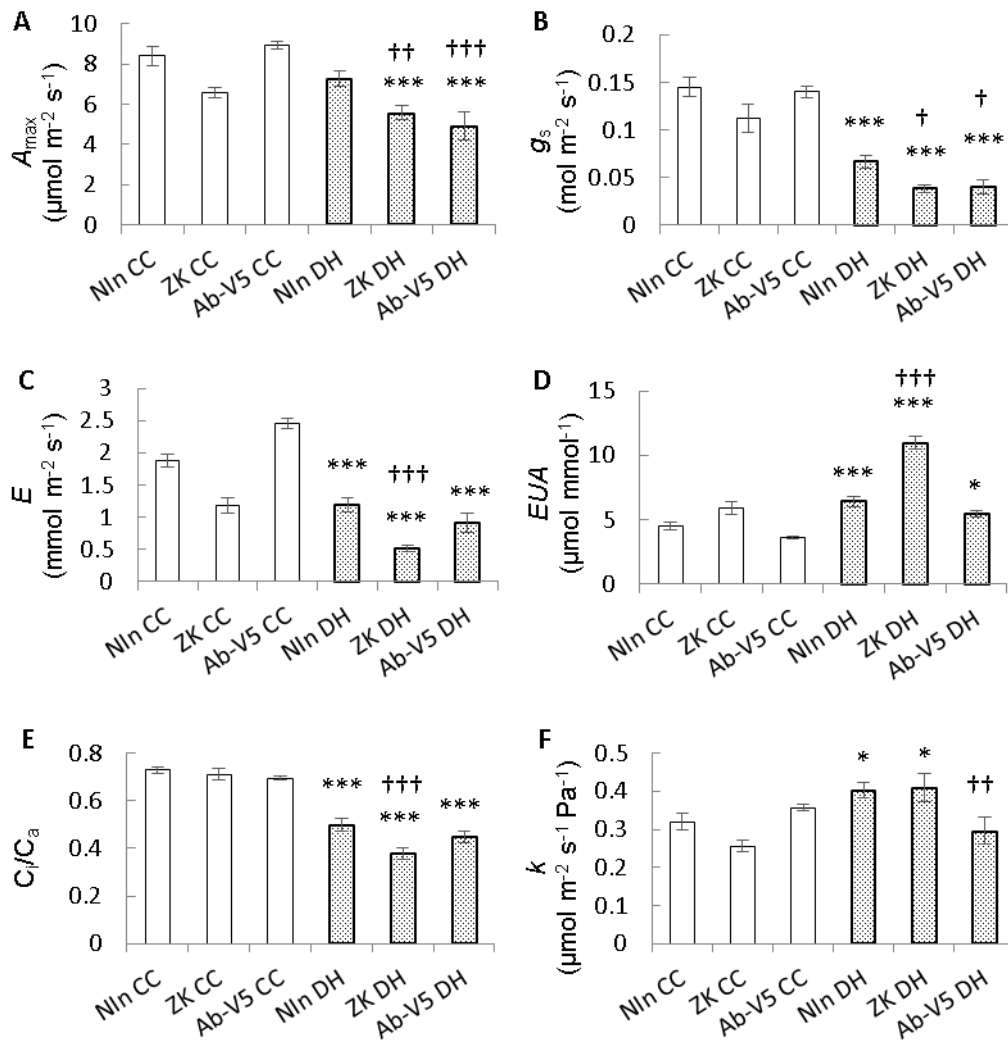
As mudas de *H. courbaril* de todos os tratamentos em DH tiveram queda na condutância estomática ( $g_s$ ), na transpiração ( $E$ ) e na razão da concentração intercelular de  $\text{CO}_2$  pela concentração ambiente ( $C_i/C_a$ ) em relação às mudas NIn CC; estas mudas também tiveram maior eficiência no uso da água ( $EUA$ ) que as mudas NIn CC (Figura 1). Entretanto, apenas as mudas inoculadas com Ab-V5 e com ZK em DH tiveram queda da assimilação líquida de  $\text{CO}_2$  ( $A_{\text{max}}$ ) em relação às

mudas NIn CC (Figura 1A). Em relação às mudas NIn DH, a inoculação com ZK em DH diminuiu a  $E$  e aumentou a  $EUA$ , enquanto a inoculação com Ab-V5 em DH diminuiu a eficiência instantânea de carboxilação ( $k$ ) (Figura 1 C, D e F).

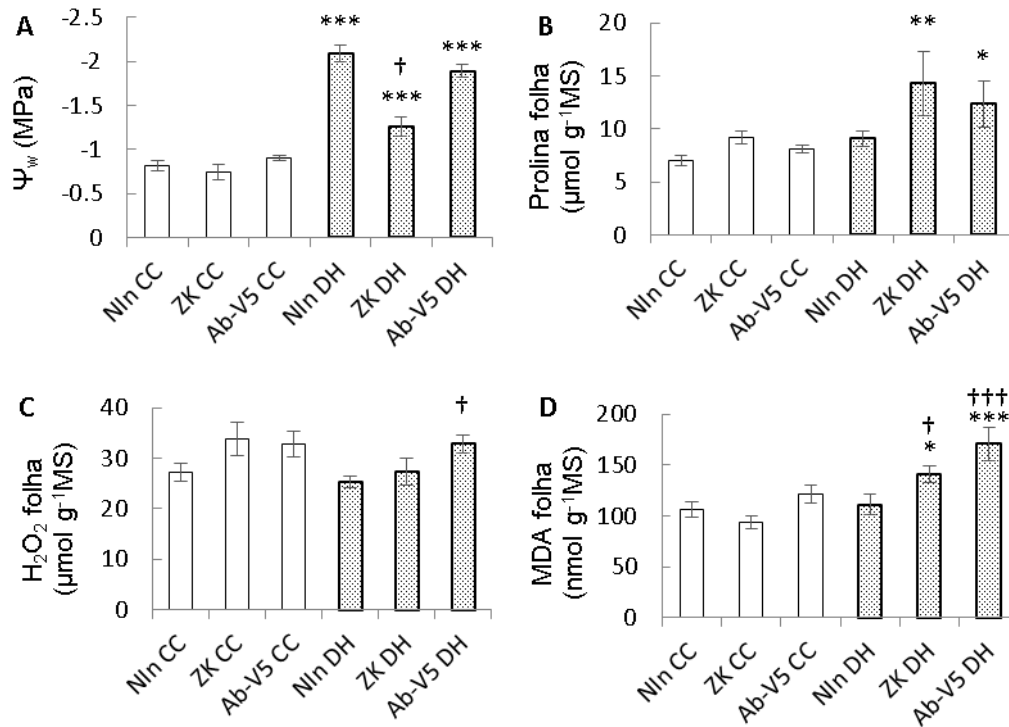
O potencial hídrico das folhas ( $\Psi_w$ ) das mudas de todos os tratamentos em DH foi menor que das mudas NIn CC, entretanto o  $\Psi_w$  das mudas inoculadas com ZK foi maior que das mudas NIn DH (Figura 2 A). As mudas inoculadas com ZK e as inoculadas com Ab-V5 em DH tiveram maior concentração de prolina que as mudas NIn CC (Figura 2 B) e a inoculação com Ab-V5 aumentou a concentração de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) das folhas das mudas em DH comparadas às NIn DH (Figura 2 C). A inoculação com ambas as bactérias aumentou a peroxidação lipídica das folhas das mudas em DH comparadas às NIn CC e às NIn DH (Figura 2 D).

A assimilação de nitrato nas folhas não diminuiu em DH em nenhum dos tratamentos, entretanto as mudas de *H. courbaril* inoculadas com Ab-V5 tiveram maior atividade da redutase do nitrato (ANR) do que as mudas NIn DH (Figura 3 A). Já a ANR das raízes foi maior em todos os tratamentos em DH quando comparados às mudas NIn CC (Figura 3 B). A inoculação com ZK e com Ab-V5 aumentou a concentração de  $NO_3^-$  nas folhas das mudas em DH comparadas às NIn CC (Figura 3 C). Já a concentração de  $NO_3^-$  nas raízes foi maior em todos os tratamentos em DH comparados às mudas NIn CC (Figura 3 D), mas as mudas em DH inoculadas com ZK tiveram menor concentração de  $NO_3^-$  nas raízes quando comparadas às NIn DH.

As mudas de todos os tratamentos em DH tiveram menor concentração de  $NH_4^+$  nas raízes do que as mudas NIn CC (Figura 3 E), já quanto à concentração foliar deste cátion não houve diferença entre os tratamentos (dados não apresentados). A concentração de aminoácidos solúveis tanto nas folhas quanto nas raízes foi maior em todas as mudas em DH em relação às NIn CC (Figura 3 F, G). As mudas não inoculadas em DH tiveram redução das proteínas solúveis nas folhas comparadas às mudas NIn CC, enquanto a inoculação com ZK em DH aumentou a concentração foliar de proteínas em relação às mudas NIn DH (Figura 3 H).

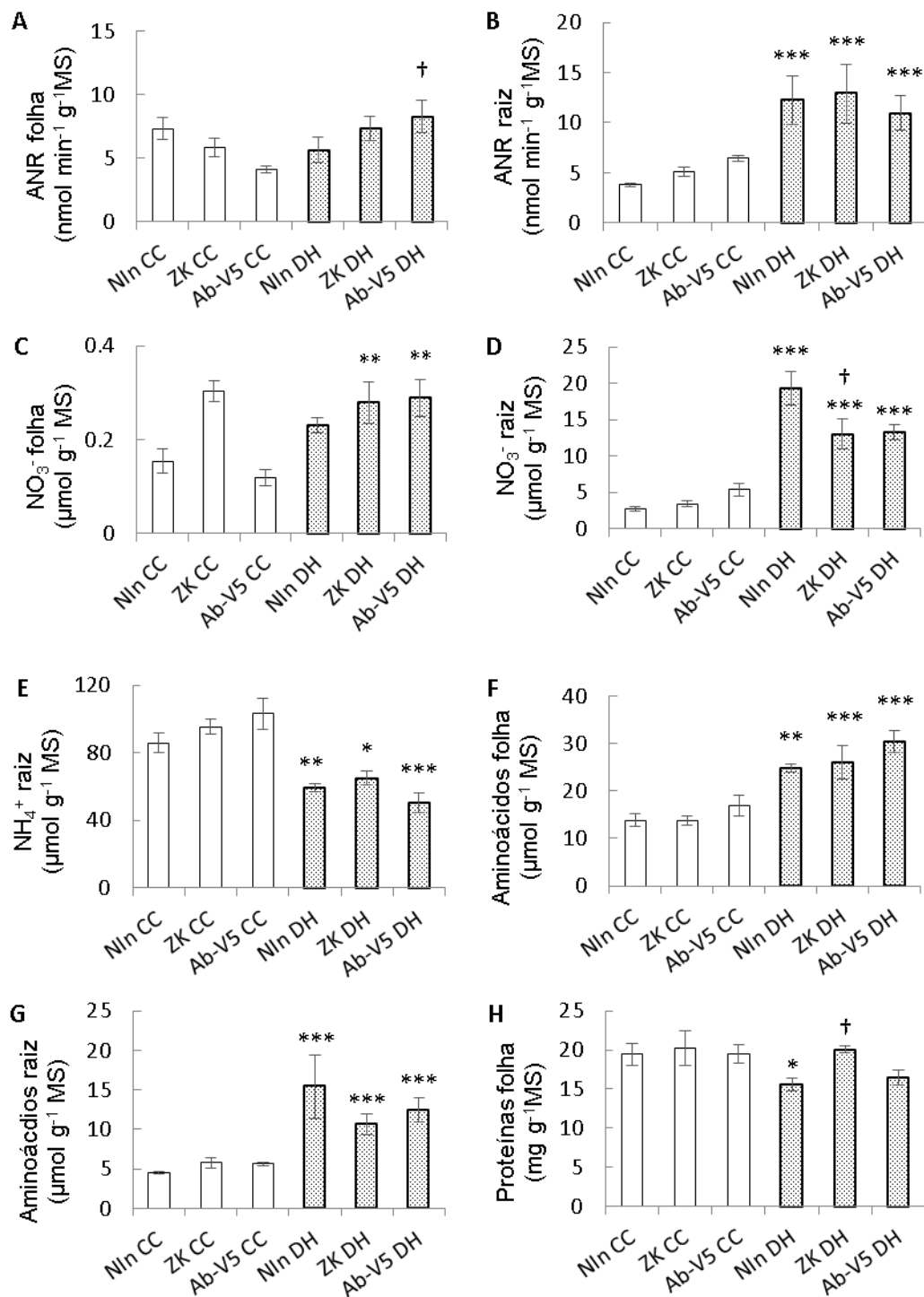


**Figura 1.** Trocas gasosas de mudas de *Hymenaea courbaril* ( $n = 10$ ). A: assimilação líquida de  $\text{CO}_2$  ( $A_{max}$ ); B: condutância estomática ( $g_s$ ); C: transpiração ( $E$ ); D: eficiência no uso da água (EUA); E: razão da concentração intercelular de  $\text{CO}_2$  pela concentração ambiente ( $C_i/C_a$ ); F: eficiência instantânea de carboxilação ( $k$ ). Barras vazias: mudas em solo na capacidade de campo (CC); barras pontilhadas: mudas em solo em déficit hídrico (DH). NIn: mudas não inoculadas com bactérias associativas; ZK: mudas inoculadas com *Bacillus velezensis*; Ab-V5: mudas inoculadas com *Azospirillum brasilense*. Asterisco indica diferença em relação às mudas NIn CC (Contrastes ortogonais);  $*=p<0,05$ ;  $***=p<0,001$ . Estilete (†) indica diferença em relação às mudas NIn DH (Contrastes ortogonais);  $\dagger=p<0,05$ ;  $\dagger\dagger=p<0,01$ ;  $\dagger\dagger\dagger=p<0,001$ .



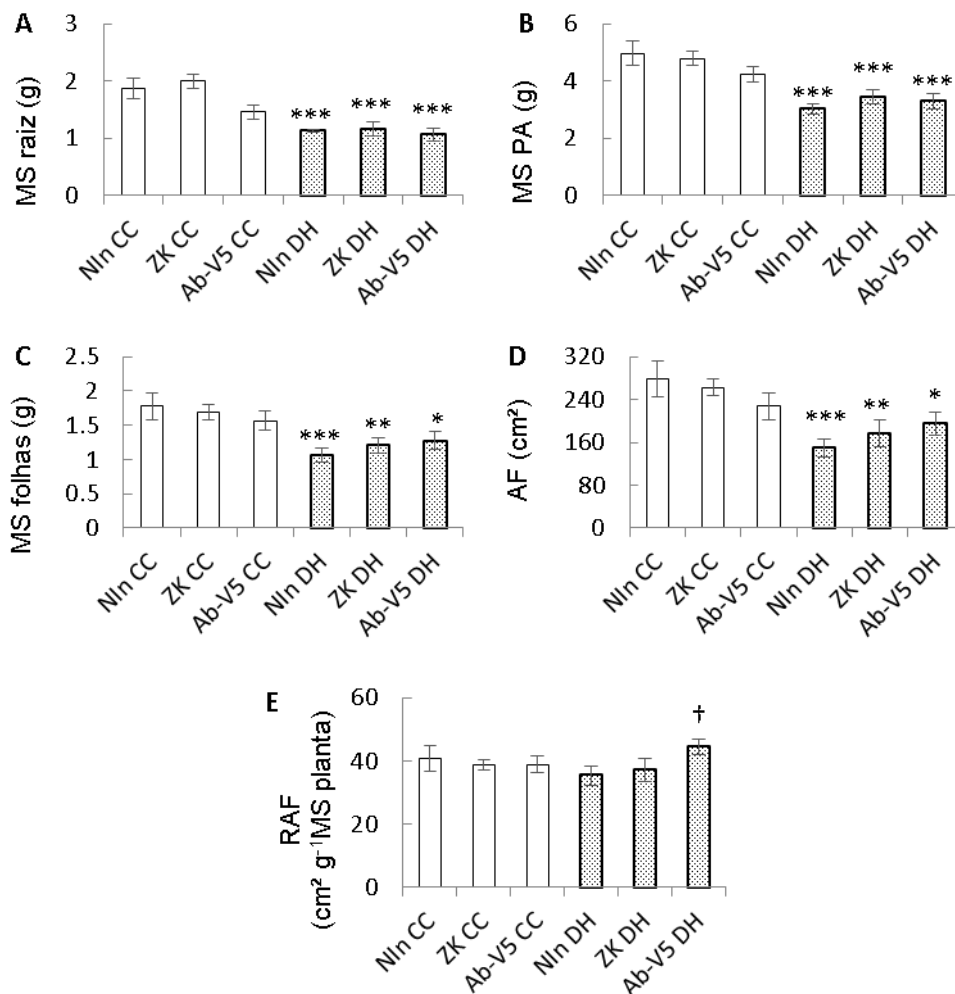
**Figura 2.** A: Potencial hídrico ( $\Psi_w$ ). Concentração de prolina (B), peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ; C), malondialdeído (MDA; D) de folhas de mudas de *Hymenaea courbaril* ( $n = 5$ ). Barras vazias: mudas em solo na capacidade de campo (CC); barras pontilhadas: mudas em solo em déficit hídrico (DH). Nln: mudas não inoculadas com bactérias associativas; ZK: mudas inoculadas com *Bacillus velezensis*; Ab-V5: mudas inoculadas com *Azospirillum brasilense*. Asterisco indica diferença em relação às mudas Nln CC (Contrastes ortogonais);  $*=p<0,05$ ;  $***=p<0,001$ . Estilete (+) indica diferença em relação às mudas Nln DH (Contrastes ortogonais);  $\dagger=p<0,05$ ;  $++=p<0,01$ ;  $+++=p<0,001$ .

As mudas de *H. courbaril* submetidas ao DH tiveram menor massa seca das raízes, da PA e das folhas em comparação às mudas Nln CC, e a área foliar total das mudas em DH foi menor que das mudas Nln CC (Figura 4 A-D). Já a razão da área foliar (RAF) das mudas em DH não diferiu das mudas Nln CC, e a inoculação com Ab-V5 em DH aumentou a RAF das mudas em relação às mudas Nln DH (Figura 4 E). A fração da massa da raiz e a fração da massa foliar não diferiram entre nenhum dos tratamentos (dados não apresentados).



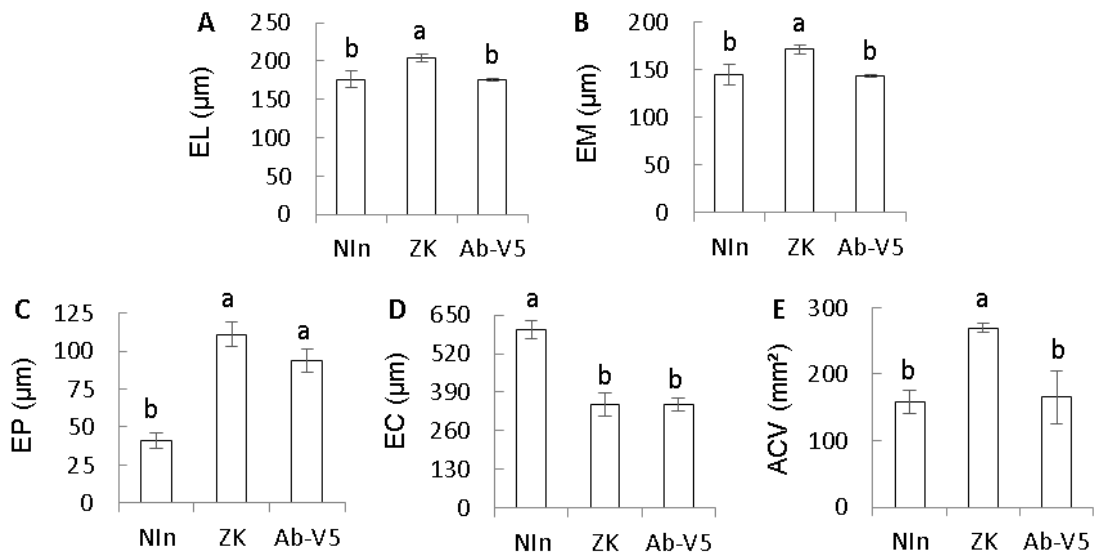
**Figura 3.** Metabolismo do N em folhas e raízes de mudas de *Hymenaea courbaril* (n = 5). A: atividade da redutase do nitrato (ANR) na folha; B: ANR raiz; C: teor de nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) na folha; D: NO<sub>3</sub><sup>-</sup> raiz; E: teor de amônio na raiz (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>); F: teor de aminoácidos na folha; G: teor de aminoácidos na raiz; H: proteínas solúveis na folha. MS: massa seca. Barras vazias: mudas em solo na capacidade de campo (CC); barras pontilhadas: mudas em solo em déficit hídrico (DH). NIn: mudas não inoculadas com bactérias associativas; ZK: mudas inoculadas com *Bacillus velezensis*; Ab-V5: mudas inoculadas com *Azospirillum brasilense*. Asterisco (\*) indica diferença em relação às mudas NIn CC; \* = p < 0,05; \*\* = p < 0,01; \*\*\* = p < 0,001. Estilote (†) indica diferença em relação às mudas NIn DH; † = p < 0,05.

A espessura do limbo (EL) e a espessura do mesofilo (EM) das mudas de *H. courbaril* inoculadas com ZK foram maiores que das mudas NIn e das inoculadas com Ab-V5 (Figura 5 A, B). Entretanto, a espessura da EAD, da EAB e dos parênquimas paliçádico e esponjoso não diferiram entre as mudas dos três tratamentos (dados não apresentados).



**Figura 4.** Biometria de mudas de *Hymenaea courbaril* (n = 10). A: massa seca (MS) da raiz; B: MS parte aérea (PA); C: MS folhas; D: área foliar total (AF); E: razão da área foliar (RAF). Barras vazias: mudas em solo na capacidade de campo (CC); barras pontilhadas: mudas em solo em déficit hídrico (DH). NIn: mudas não inoculadas com bactérias associativas; ZK: mudas inoculadas com *Bacillus velezensis*; Ab-V5: mudas inoculadas com *Azospirillum brasilense*. Asterisco (\*) indica diferença em relação às mudas NIn CC; \*= $p < 0,05$ ; \*\*= $p < 0,01$ ; \*\*\*= $p < 0,001$ . Estilete (†) indica diferença em relação às mudas NIn DH; †= $p < 0,05$ .

Quanto à anatomia das raízes, a inoculação com ZK e com Ab-V5 aumentou a espessura da periderme (EP), e as mudas inoculadas com ZK tiveram menor espessura do córtex (EC) que as mudas NIn (Figura 5 C, D). Além disso, as mudas com ZK tiveram maior área do cilindro vascular (ACV) que as mudas NIn e as inoculadas com Ab-V5 (Figura 5 E). Já a espessura do cilindro vascular e a espessura total da raiz não diferiram entre os tratamentos (dados não apresentados).



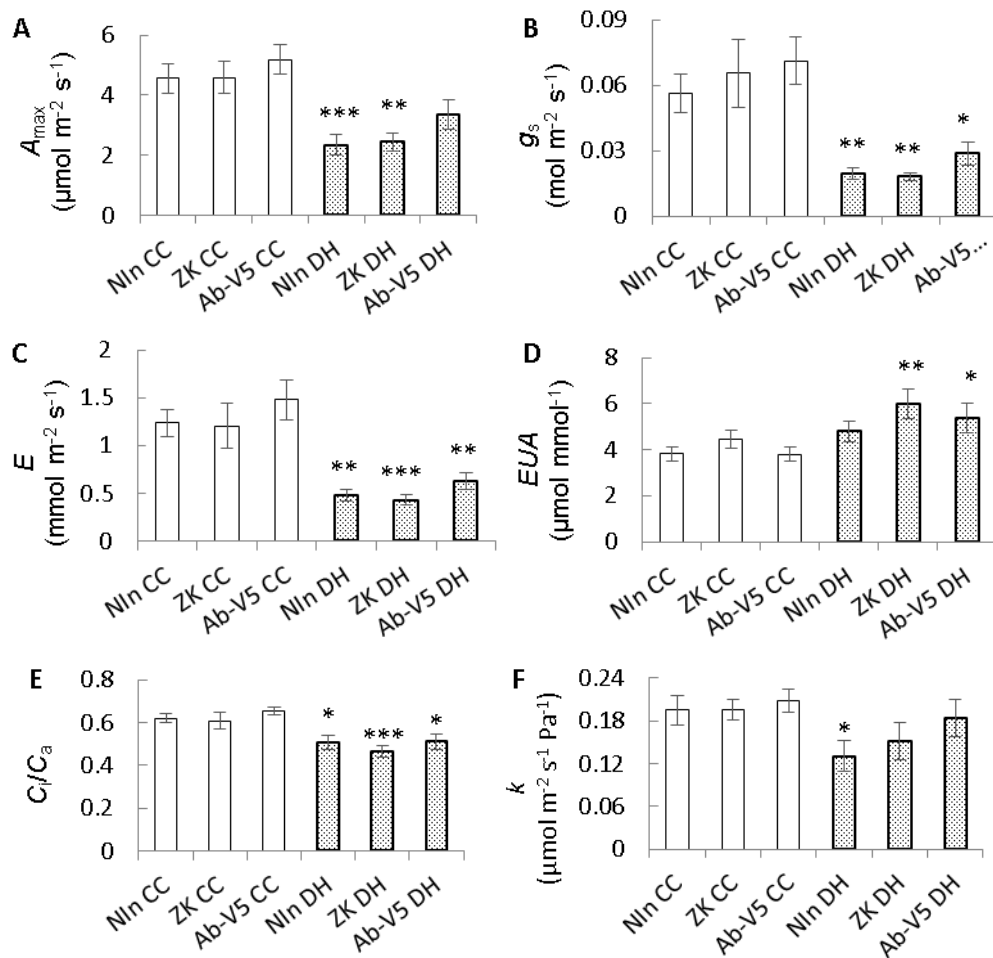
**Figura 5.** Parâmetros anatômicos de folhas e de raízes de mudas de *Hymenaea courbaril* (n = 3). Parâmetros foliares: A: espessura do limbo (EL); B: espessura do mesofilo (EM). Parâmetros radiciais: C: espessura da periderme (EP); D: espessura do córtex (EC); E: área do cilindro vascular (ACV). Barras vazias: mudas em solo na capacidade de campo. NIn: mudas não inoculadas com bactérias associativas; ZK: mudas inoculadas com *Bacillus velezensis*; Ab-V5: mudas inoculadas com *Azospirillum brasilense*. Letras diferentes indicam diferença significativa, Anova de um fator e Teste de Fisher DMS ( $\alpha = 0,05$ ).

### 1.3.2. *Bauhinia forficata*

As mudas de *B. forficata* em DH inoculadas com Ab-V5 tiveram a fotossíntese líquida ( $A_{max}$ ) igual das mudas NIn CC. Já as mudas NIn DH e com ZK DH tiveram redução da  $A_{max}$  comparadas às NIn CC (Figura 6 A). As mudas submetidas ao DH tiveram redução da condutância estomática ( $g_s$ ) e da transpiração ( $E$ ) em relação às mudas NIn CC. Entretanto, apenas as mudas inoculadas com ZK e com Ab-V5 em DH tiveram maior  $EUA$  do que as mudas NIn CC (Figura 6 D). A razão  $C_i/C_a$  foi

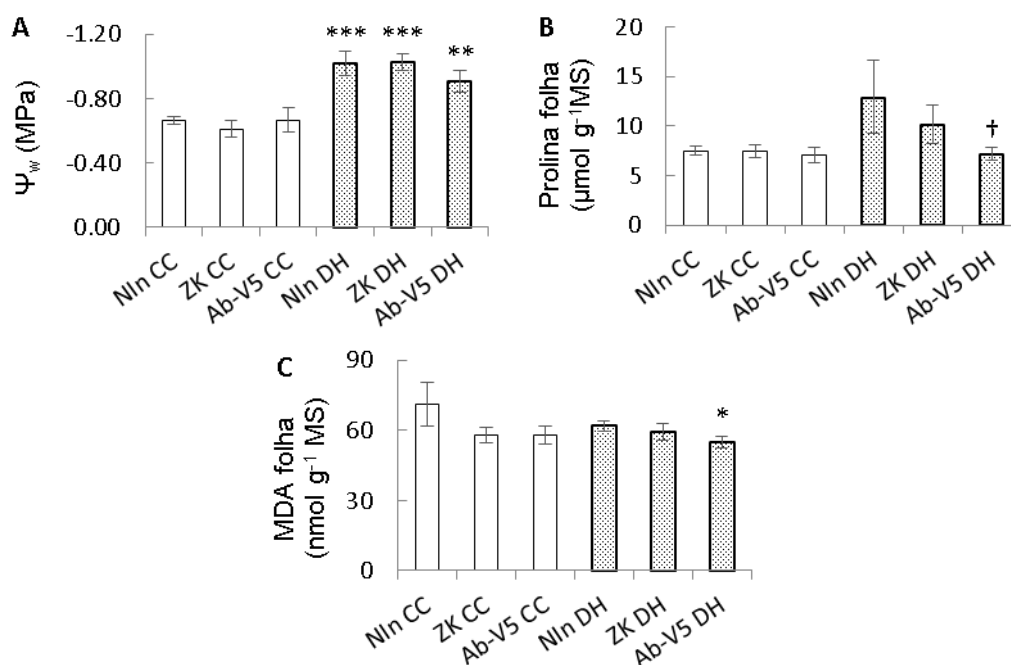
menor em todas as mudas em DH, enquanto a eficiência instantânea de carboxilação ( $k$ ) foi menor apenas nas mudas NIn em DH, quando comparadas às NIn CC (Figura 6 E, F).

O DH diminuiu o potencial hídrico ( $\Psi_w$ ) das folhas das mudas de *B. forficata* de todos os tratamentos (Figura 7 A). Apenas nas mudas inoculadas com Ab-V5 em DH houve aumento da concentração de prolina em relação às mudas NIn DH com redução da peroxidação lipídica nas mudas inoculadas com esta estirpe em relação às mudas NIn CC (Figura 7 B, C).

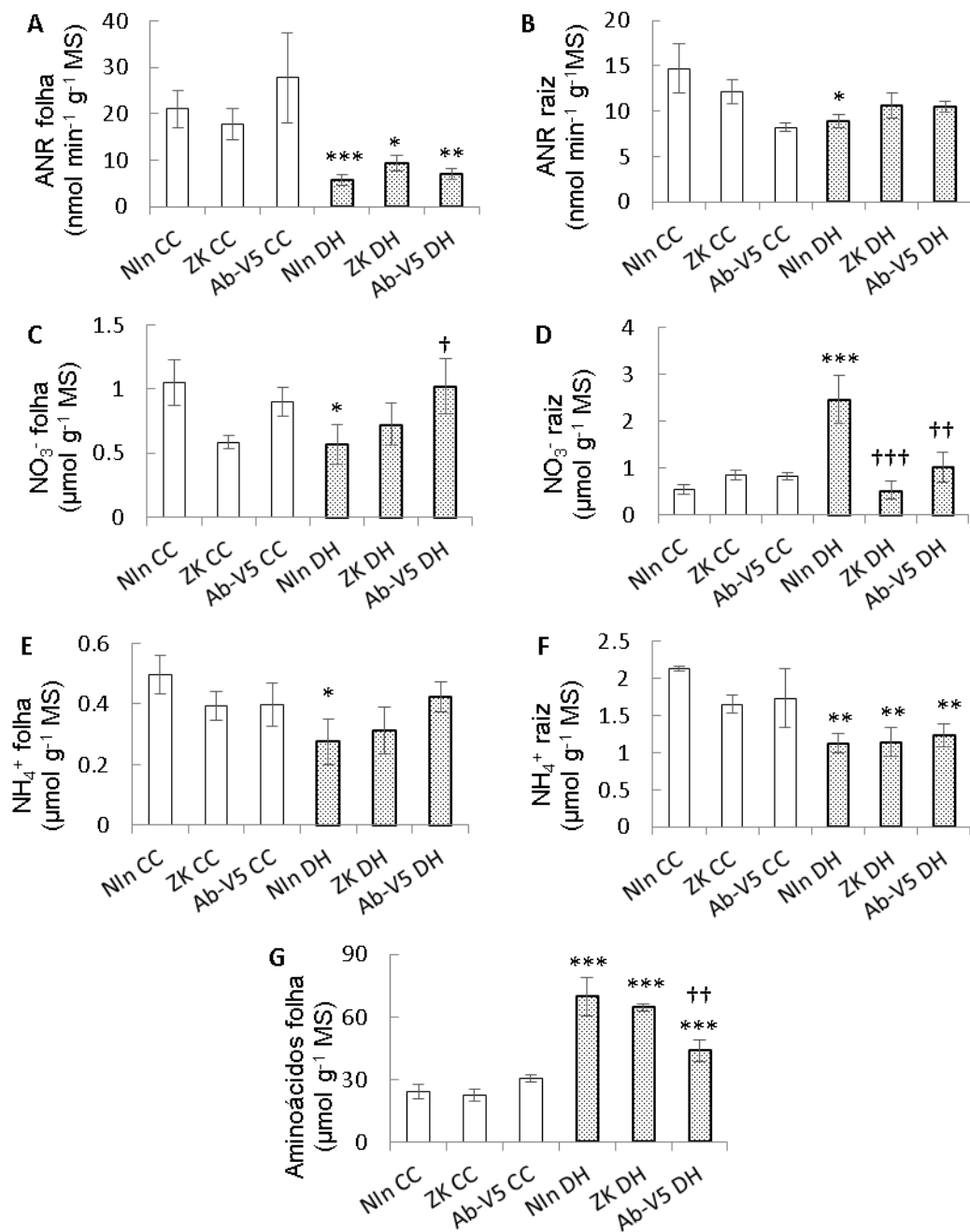


**Figura 6.** Trocas gasosas de folhas de mudas de *Bauhinia forficata* ( $n = 12$ ). A: assimilação líquida de  $\text{CO}_2$  ( $A_{max}$ ); B: condutância estomática ( $g_s$ ); C: transpiração ( $E$ ); D: eficiência no uso da água ( $EUA$ ); E: razão da concentração intercelular de  $\text{CO}_2$  pela concentração ambiente ( $C_i/C_a$ ); F: eficiência instantânea de carboxilação ( $k$ ). Barras vazias: mudas em solo na capacidade de campo (CC); barras pontilhadas: mudas em solo em déficit hídrico (DH). NIn: mudas não inoculadas com bactérias associativas; ZK: mudas inoculadas com *Bacillus velezensis*; Ab-V5: mudas inoculadas com *Azospirillum brasilense*. Asterisco indica diferença em relação às mudas NIn na CC (Contrastes ortogonais); \*= $p < 0,05$ ; \*\*= $p < 0,01$ ; \*\*\*= $p < 0,001$ .

Houve redução da ANR nas folhas das mudas em DH em relação às mudas NIn CC, mas a ANR na raiz foi menor apenas nas mudas NIn DH (Figura 8 A, B). A concentração de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) nas folhas das mudas inoculadas com Ab-V5 e com ZK foi maior que das mudas NIn DH, e as mudas NIn DH tiveram redução da concentração deste ânion em relação às NIn CC (Figura 8 C). Nas raízes foi observado o inverso, a concentração de  $\text{NO}_3^-$  das mudas NIn DH foi maior que das mudas NIn CC, e a inoculação com ZK e com Ab-V5 reduziu a concentração de  $\text{NO}_3^-$  em relação às mudas NIn DH (Figura 8 D).



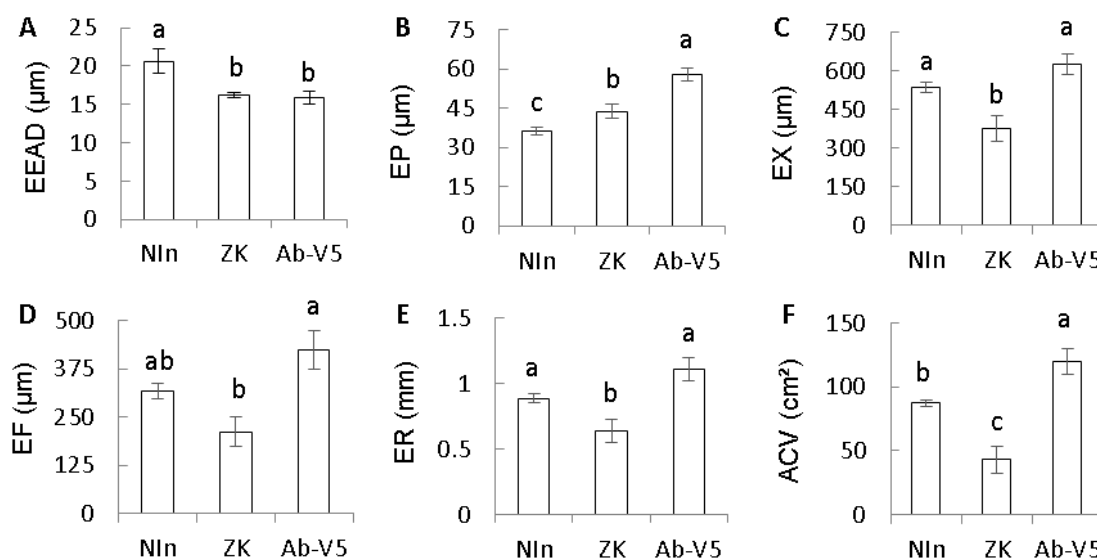
**Figura 7.** Potencial hídrico ( $\Psi_w$ ; A), prolina (B) e concentração de malondialdeído (MDA; C) de folhas de mudas de *Bauhinia forficata* ( $n = 5$ ). Barras vazias: mudas em solo na capacidade de campo (CC); barras pontilhadas: mudas em solo sob déficit hídrico moderado (DH). NIn: mudas não inoculadas com bactérias associativas; ZK: mudas inoculadas com *Bacillus velezensis*; Ab-V5: mudas inoculadas com *Azospirillum brasilense*. Asterisco (\*) indica diferença em relação às mudas NIn na CC; \*= $p < 0,05$ ; \*\*= $p < 0,01$ ; \*\*\*= $p < 0,001$ . Estilete (†) indica diferença em relação às mudas NIn em DH; †= $p < 0,05$ .



**Figura 8.** Metabolismo do N de folhas e raízes de mudas de *Bauhinia forficata* (n = 5). A: atividade da redutase do nitrato (ANR) na folha; B: ANR na raiz; C: teor de nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) na folha; D: NO<sub>3</sub><sup>-</sup> raiz; E: teor de amônio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) na folha; F: NH<sub>4</sub><sup>+</sup> raiz; G: aminoácidos na folha. MS: massa seca. Barras vazias: mudas em solo na capacidade de campo (CC); barras pontilhadas: mudas em solo em déficit hídrico (DH). NIn: mudas não inoculadas com bactérias associativas; ZK: mudas inoculadas com *Bacillus velezensis*; Ab-V5: mudas inoculadas com *Azospirillum brasilense*. Asterisco (\*) indica diferença em relação às mudas NIn CC; \* = p < 0,05; \*\* = p < 0,01; \*\*\* = p < 0,001. Estilete (†) indica diferença em relação às mudas NIn em DH. † = p < 0,05; †† = p < 0,01; ††† = p < 0,001.

A concentração foliar de amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) foi reduzida apenas nas mudas NIn DH em comparação com as mudas NIn CC (Figura 8 E). Nas raízes, as mudas de todos os tratamentos em DH tiveram menor concentração de  $\text{NH}_4^+$  do que as mudas NIn CC (Figura 8 F). Já a concentração de aminoácidos solúveis nas folhas aumentou nas mudas de todos os tratamentos em DH e as mudas inoculadas com Ab-V5 em DH também tiveram mais aminoácidos do que as mudas NIn DH (Figura 8 G). A concentração de aminoácidos das raízes não diferiu entre os tratamentos (dados não apresentados).

O crescimento das mudas de *B. forficata* não foi afetado pelo DH e nem pela inoculação com as BAs (dados não apresentados). Considerando a anatomia foliar, as mudas inoculadas com ZK e com Ab-V5 apresentaram menor espessura da epiderme da face adaxial (EAD) que as mudas NIn (Figura 9). Entretanto, a espessura da EAB, do mesofilo, e do limbo não foram afetadas pela inoculação (dados não apresentados).



**Figura 9.** Parâmetros anatômicos de folhas e raízes de mudas de *Bauhinia forficata* ( $n = 4$ ). Parâmetro foliar: A: Espessura da epiderme da face adaxial (EEAD). Parâmetros radiciais: B: espessura da periderme (EP); C: espessura do xilema secundário (EX); D: espessura do floema secundário (EF); E: espessura total da raiz (ER); F: área do cilindro vascular (ACV). Barras vazias: mudas em solo na capacidade de campo (CC). NIn: mudas não inoculadas com bactérias associativas; ZK: mudas inoculadas com *Bacillus velezensis*; Ab-V5: mudas inoculadas com *Azospirillum brasilense*. Letras diferentes indicam diferença significativa, Anova de um fator e Teste de Fisher DMS ( $\alpha = 0,05$ ).

As mudas de *B. forficata* inoculadas com ZK e com Ab-V5 tiveram maior espessura da periderme (EP) das raízes que as mudas NIn, e as mudas inoculadas com Ab-V5 tiveram a EP maior que das mudas com ZK (Figura 9 B). A inoculação com ZK diminuiu a espessura do xilema secundário (EX) e a espessura total das raízes tanto em relação às mudas NIn quanto às com Ab-V5, enquanto a espessura do floema secundário (EF) das mudas com ZK foi menor apenas que a das mudas inoculadas com Ab-V5 (Figura 9 C-E). Além disso, as mudas com ZK tiveram menor área do cilindro vascular (ACV) enquanto as mudas com Ab-V5 tiveram maior ACV entre os três tratamentos (Figura 9 F).

#### 1.4. DISCUSSÃO

##### 1.4.1. Trocas Gasosas

As mudas de *H. courbaril* tiveram queda na  $g_s$  e na  $E$  em DH, mas apenas as mudas inoculadas com ZK e as com Ab-V5 tiveram queda na  $A_{max}$ . A queda da  $g_s$  pode indicar uma resposta ao ABA (Bray, 1997; Assman, 2003; Desikan *et al.*, 2004), que tem sua concentração aumentada na parte aérea de plantas em solo com déficit hídrico, diminuindo a perda de água por transpiração (Zhang e Davies, 1990; Wilkinson e Davies, 2002; Kim *et al.*, 2012). As mudas inoculadas com ZK tiveram aumento da  $EUA$  em relação às NIn DH. Zhang *et al.* (2019) também encontraram aumento da  $EUA$  em mudas de *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. inoculadas com *Bacillus pumilus* em DH. Li *et al.* (2016) verificaram que a aplicação foliar de *Bacillus subtilis* em *Vicia faba* L. diminuiu a fotossíntese, a  $g_s$  e a  $E$ , aumentando a  $EUA$ . A queda na  $g_s$  e, conseqüentemente na  $A_{max}$ , com aumento na  $EUA$  das mudas de *H. courbaril* inoculadas com ZK em DH pode indicar tolerância ao DH, evitando maior desidratação da folha e protegendo a planta dos efeitos danosos da perda de turgescência (Chaves *et al.*, 2009).

As mudas de *H. courbaril* NIn e as com ZK em DH tiveram maior  $k$  que as mudas NIn CC e menor  $C_i/C_a$  que estas últimas, indicando que mesmo com o fechamento estomático, estas mudas estão fixando o  $CO_2$  disponível no mesofilo de maneira eficiente, o que é importante em uma condição em que abrir os estômatos resulta numa perda de água excessiva em relação a captação de  $CO_2$  (Chaves *et al.*, 2002, 2009). Isto fica mais evidente para as mudas inoculadas com ZK, que

tiveram a  $C_i/C_a$  menor que das mudas NIn DH.

As mudas de *B. forficata* inoculadas com Ab-V5 em DH mantiveram a assimilação líquida de  $CO_2$  igual das mudas NIn CC, mesmo com menor  $g_s$  e menor  $E$ , o que aumentou a  $EUA$  destas mudas. Isto indica que Ab-V5 impediu o efeito danoso do DH sobre o metabolismo fotossintético destas mudas, demonstrando o potencial da inoculação com esta estirpe em mudas de *B. forficata* destinadas ao plantio em áreas de reflorestamento ativo. Omar *et al.* (2009) verificaram aumento da fotossíntese em plantas de cevada inoculadas com *A. brasilense* (NO40) de duas cultivares submetidas a estresse salino, e os efeitos positivos da inoculação foram mais evidentes na cultivar mais sensível a este estresse. Tiepo *et al.* (2018) verificaram aumento da  $A_{max}$  em mudas de *Cariniana estrellensis* inoculadas com Ab-V5 em DH comparadas às mudas não inoculadas. Considerando que o déficit hídrico e o estresse salino apresentam efeitos similares no metabolismo das plantas (Bray, 1997), pode-se inferir que *A. brasilense* é uma bactéria associativa que pode aumentar a tolerância das plantas a estes dois estresses.

Apesar da queda na  $A_{max}$  nas mudas de *B. forficata* inoculadas com ZK, as mudas inoculadas tanto com ZK quanto com Ab-V5 mantiveram a  $k$  em relação às mudas NIn CC e tiveram menor  $C_i/C_a$  que estas mudas, indicando maior eficiência na assimilação do  $CO_2$  do meio intercelular quando em DH, como observado para as mudas de *H. courbaril* inoculadas com ZK.

#### 1.4.2. Potencial Hídrico, Prolina, $H_2O_2$ e MDA

O DH diminuiu o  $\Psi_w$  das mudas de *H. courbaril*, entretanto as mudas inoculadas com ZK tiveram maior  $\Psi_w$  que as mudas NIn DH. As mudas de *H. courbaril* inoculadas com ZK em DH tiveram uma diminuição de 1,6 vezes no  $\Psi_w$  quando comparadas às NIn CC, já as inoculadas com Ab-V5 em DH tiveram o  $\Psi_w$  2,3 vezes mais negativo, e as NIn DH tiveram o  $\Psi_w$  2,6 vezes mais negativo em relação às NIn CC. Isto indica que a associação com ZK diminuiu a perda excessiva de água das folhas devido à restrição hídrica no solo, amenizando os efeitos do DH, o que pode estar relacionado à maior  $EUA$  encontrada nestas mudas. Vardharajula *et al.* (2011) também verificaram aumento do  $\Psi_w$  em mudas de milho inoculadas com estirpes de *Bacillus* sp. e submetidas ao DH. Brodrribb *et al.* (2003) encontraram para

indivíduos adultos de *H. courbaril* de uma Floresta Tropical Estacional Seca que o  $\Psi_w$  em que ocorre a perda do turgor celular é -2,17 MPa, e o  $\Psi_w$  em que ocorre perda de 50% da condutividade do xilema é -3 MPa. Assim, pode-se inferir que as mudas associadas a ZK tiveram manutenção do turgor das folhas ( $\Psi_w = -1,26$  MPa) e podem ter menor susceptibilidade à cavitação que as mudas NIn e inoculadas com Ab-V5.

Nas mudas de *B. forficata*, o DH diminuiu o  $\Psi_w$  das folhas das mudas de todos os tratamentos. As mudas de *B. forficata* inoculadas com Ab-V5 em DH tiveram o  $\Psi_w$  1,3 vezes mais negativo que as NIn CC e a  $g_s$  reduzida em 50% em relação às NIn CC, as mudas NIn DH e com ZK em DH tiveram o  $\Psi_w$  1,5 vezes mais negativo e a  $g_s$  3 vezes menor do que as NIn CC. Existe um *trade-off* entre a  $g_s$  máxima em folhas hidratadas e a sensibilidade à desidratação, de modo que algumas espécies apresentam um potencial hídrico mais alto quando ocorre 50% de perda da  $g_s$ , indicando que há um controle estomático maior quando em situações de déficit hídrico (Henry *et al.*, 2019). As mudas de *B. forficata* tiveram uma pequena variação no  $\Psi_w$  das folhas, mas apresentaram significativo fechamento estomático, indicando que as mudas desta espécie têm os estômatos sensíveis à desidratação e a inoculação com as bactérias não afetou estas respostas ao DH. Isto pode ser importante em ambientes de reflorestamento, pois sob condições de estresse moderado, o fechamento estomático evita a perda excessiva de água, aumentando a eficiência de seu uso na planta toda (Chaves *et al.*, 2009).

As mudas de *H. courbaril* inoculadas com ZK e com Ab-V5 tiveram aumento no conteúdo de prolina em DH, e este soluto compatível pode ter papel na resposta antioxidante, na manutenção da integridade de proteínas e na proteção de membranas (Alia *et al.*, 1997; Szabados e Savouré, 2009), e indica uma possível resposta de proteção de dano oxidativo induzida pela inoculação com ZK e Ab-V5. Tiepo *et al.* (2018) também encontraram aumento do conteúdo de prolina nas folhas de mudas de *Cariniana estrellensis* submetidas ao déficit hídrico e inoculadas com *Azomonas* sp. Os resultados encontrados para as mudas de *H. courbaril*, assim como os encontrados por Tiepo *et al.* (2018), demonstram que a inoculação com bactérias associativas de mudas arbóreas de espécies tolerantes à sombra aumenta esta resposta de tolerância ao DH.

Entretanto, as mudas de *H. courbaril* inoculadas com ZK e com Ab-V5 em DH, tiveram maior concentração de MDA, indicativo de peroxidação lipídica. Estas mudas

apresentaram queda da  $A_{max}$ , o que pode aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio (Carvalho, 2008) e, portanto, pode aumentar a peroxidação lipídica. As mudas inoculadas com Ab-V5 em DH, além da menor  $k$  em relação às mudas NIn DH, tiveram maior concentração de  $H_2O_2$  nas folhas. A atividade de oxigenação da Rubisco pode ter aumentado em relação à carboxilação nas folhas destas mudas, como pode ocorrer em situações de DH em que há diminuição da disponibilidade de  $CO_2$  no meio intercelular, sendo que a fotorrespiração produz a maior parte do  $H_2O_2$  presente nas folhas quando há queda da fotossíntese (Noctor *et al.*, 2002). Noctor *et al.* (2002) sugerem que a fotorrespiração e o  $H_2O_2$  podem ter um papel importante nas respostas de aclimatação das plantas ao DH, portanto, apesar do estresse inicial, é possível que as mudas de *H. courbaril* inoculadas com Ab-V5 apresentem maior aclimatação a este estresse.

Ao contrário do observado para as mudas de *H. courbaril*, as mudas de *B. forficata* inoculadas com Ab-V5 tiveram redução da concentração de prolina em DH em relação às mudas NIn. Ainda, as mudas de *B. forficata* não apresentaram acúmulo foliar de prolina como resposta ao DH. Apesar de o DH não ter aumentado a peroxidação lipídica nas folhas destas mudas, apenas as mudas inoculadas com Ab-V5 tiveram diminuição da concentração foliar de MDA em relação às NIn CC. Isto indica que a associação com Ab-V5 pode ter induzido mecanismos de redução de danos oxidativos, de modo que a peroxidação lipídica foi menor até do que aquelas mudas mantidas em solo sem restrição hídrica. Fukami *et al.* (2017) verificaram que a inoculação de sementes de milho com *A. brasilense* Ab-V5 e Ab-V6 aumentou a expressão de genes de enzimas antioxidantes nas folhas, sugerindo que a inoculação com *A. brasilense* pode aumentar a resposta antioxidante das plantas.

#### 1.4.3. Metabolismo do N

Mudas de *H. courbaril* em DH aumentaram a assimilação de  $NO_3^-$  nas raízes (maior ANR), e diminuíram a concentração de  $NH_4^+$  nas raízes, acompanhado de aumento na concentração dos aminoácidos tanto nas folhas quanto nas raízes, o que pode indicar aumento da assimilação de  $NH_4^+$  nas raízes também. Possivelmente devido à maior assimilação de nitrogênio, estas mudas também apresentaram acúmulo de aminoácidos tanto nas folhas quanto nas raízes em DH. Bowne *et al.* (2012) também observaram aumento do conteúdo de diversos

aminoácidos em folhas de cultivares de trigo submetidas ao déficit hídrico. Estes autores identificaram os aminoácidos acumulados e verificaram que alguns deles podem prevenir danos oxidativos e, portanto, têm papel na resposta de tolerância ao DH (Bowne *et al.*, 2012). No presente estudo, o acúmulo de aminoácidos observado tanto nas raízes quanto nas folhas de mudas de *H. courbaril* pode ter relação com respostas de tolerância ao DH que não foram afetadas pela inoculação com as BAs.

Entretanto, a inoculação com Ab-V5 nas mudas de *H. courbaril* em DH aumentou a ANR das folhas em relação às mudas NIn DH, demonstrando que esta associação alterou o metabolismo foliar do  $\text{NO}_3^-$  nestas mudas. El-Komy *et al.* (2003) também encontraram aumento da atividade da redutase do nitrato na parte aérea de plantas de trigo inoculadas com estirpes de *Azospirillum* em DH. A estirpe de *A. brasilense* não possuía NR e a estirpe de *A. lipoferum* possuía, e ambas aumentaram a ANR na parte aérea, sendo que a estirpe com NR também aumentou esta atividade nas raízes (El-Komy *et al.*, 2003), o que indica que tanto a atividade enzimática da bactéria quanto da planta podem contribuir para a maior assimilação de nitrato nas mudas inoculadas (García de Salomone e Döbereiner, 1996). A maior assimilação de nitrato nas folhas das mudas de *H. courbaril* inoculadas com Ab-V5 em DH pode ser importante, já que quando há queda da fotossíntese líquida devido à queda na disponibilidade de  $\text{CO}_2$  e alta luminosidade, a nitrito redutase pode receber elétrons da Ferredoxina para reduzir o nitrito a amônio (Bloom *et al.*, 2002; Bloom *et al.*, 2010; Bloom, 2015), o que pode diminuir possíveis danos fotoinibitórios. Ainda, a redução do nitrato a nitrito no citosol pela NR pode utilizar NADH originado do malato exportado dos cloroplastos como equivalente redutor, balanceando o estado redox da célula (Rathnam, 1978; Tischner, 2000; Taniguchi e Miyake, 2012).

Diferente das mudas de *H. courbaril*, as mudas de *B. forficata* tiveram queda na ANR da folha em todos os tratamentos em DH. Isto está em acordo com o observado na literatura para diversas plantas cultivadas (Foyer *et al.*, 1998; Garg *et al.*, 2001; Correia *et al.*, 2005; Fresneau *et al.*, 2007; Hemaprabha *et al.*, 2013). Já nas mudas de *B. forficata* inoculadas com bactérias, a ANR das raízes não diminuiu em DH. Esta manutenção do metabolismo do  $\text{NO}_3^-$  nas raízes em DH demonstra que as bactérias também alteram o metabolismo do N nestas mudas, mas principalmente nas raízes. Esta assimilação de  $\text{NO}_3^-$  nas raízes pode ter contribuição da atividade enzimática das bactérias e permite o aporte de N para o metabolismo das mudas (Baldani *et al.*, 1986; García de Salomone e Döbereiner, 1996; El-Komy *et al.*, 2003)

A absorção de  $\text{NO}_3^-$  nas mudas de *B. forficata* não parece ter sido afetada pelo DH, já que houve um acúmulo deste ânion nas raízes das mudas NIn DH, o que não foi observado nas mudas inoculadas. Apesar da diminuição da ANR nas mudas NIn, a concentração de aminoácidos nas folhas das mudas em DH aumentou em todos os tratamentos, assim como encontrado para as mudas de *H. courbaril*, sugerindo que as mudas de *B. forficata* também apresentam esta resposta de tolerância ao DH.

As mudas de *H. courbaril* inoculadas com Ab-V5 mantiveram o conteúdo de proteínas solúveis nas folhas em relação às mudas NIn CC, enquanto as mudas inoculadas com ZK tiveram mais proteínas solúveis que as mudas NIn DH. Considerando que quase metade das proteínas solúveis foliares em plantas  $\text{C}_3$  correspondem à Rubisco (Ellis, 1979; Parry *et al.*, 2003), é possível que estas mudas vão produzir mais fotossintatos que as mudas NIn. Isto pode resultar em maior crescimento, e maior capacidade competitiva destas mudas no campo, especialmente nas mudas inoculadas com ZK que tiveram maior  $k$  que as mudas NIn CC.

#### 1.4.4. Biometria

O DH diminuiu o crescimento das mudas de *H. courbaril*, com redução da massa seca das raízes, das folhas, da parte aérea e da área foliar total. Estas mudas pararam de expandir folhas e apresentaram senescência foliar em resposta ao DH, ainda é possível que estas plantas tenham tido morte de raízes no período de 30 dias de restrição hídrica. Osório *et al.* (1998) também encontraram redução do crescimento em mudas de três clones de eucalipto submetido ao DH, estes autores sugeriram que a redução do crescimento pode ter relação com a menor área foliar e consequentemente menor assimilação de C nas plantas estressadas. A inibição do crescimento e abscisão foliar quando em DH pode indicar aclimatação ao estresse, já que estes eventos podem diminuir o consumo de água e podem, portanto, ajudar a manter o balanço hídrico das plantas (Munné-Bosch e Alegre, 2004; Chaves *et al.*, 2009).

Já as mudas de *B. forficata* não tiveram seu crescimento afetado pelo DH, e, mesmo com a queda da  $A_{\text{max}}$  observada nas mudas NIn e nas mudas com ZK, o crescimento foi mantido. É possível que a manutenção da área foliar total e a

manutenção das raízes tenham resultado numa absorção de água e fotossíntese líquida que impediram a redução do crescimento. O maior controle estomático apresentado pelas mudas de *B. forficata* indica uma estratégia de evitação da seca (Brunner *et al.*, 2015) que pode ter prevenido a desidratação excessiva, resultando na manutenção do crescimento durante os 30 dias de estresse a que as mudas foram submetidas.

#### 1.4.5. Anatomia

As folhas das mudas de *H. courbaril* inoculadas com ZK tiveram maior espessura do mesofilo. Isto indica aumento dos tecidos parenquimáticos (paliçádico e esponjoso) e maior capacidade fotossintética devido à maior absorção da luz, especialmente devido ao parênquima paliçádico, e maior condutividade do CO<sub>2</sub>, devido ao parênquima esponjoso e seus espaços intercelulares (Tomás *et al.*, 2013; Crang *et al.*, 2018). Esta alteração provocada nas plantas inoculadas com ZK pode tornar estas mudas mais tolerantes à seca quando submetidas a este estresse.

A alteração anatômica das mudas inoculadas com ZK pode ter influenciado na maior *k* observada nas mudas em DH comparadas às mudas NIn CC, já que além da queda na condutância estomática em DH, também ocorre a queda da condutância do CO<sub>2</sub> no mesofilo em plantas sob restrição hídrica (Flexas *et al.*, 2002; 2004), o que possivelmente não ocorreu nas mudas com ZK. Paradiso *et al.* (2017), em estudo com plantas de soja cultivadas em hidroponia e inoculadas com diversos microorganismos promotores do crescimento incluindo fungos micorrízicos e não micorrízicos, leveduras, e 14 espécies de bactérias, encontraram aumento da espessura do parênquima paliçádico e dos espaços intercelulares no parênquima esponjoso. Estas alterações anatômicas contribuiriam para maior assimilação de CO<sub>2</sub> das mudas inoculadas (Paradiso *et al.*, 2017).

A inoculação com as BAs aumentou a espessura da periderme das raízes de ambas as espécies, sendo que para as mudas de *B. forficata*, as mudas inoculadas com Ab-V5 também tiveram maior espessura deste tecido em relação às com ZK. A periderme é um tecido originado durante o crescimento secundário que tem papel importante na proteção das raízes e caules contra patógenos e perda de água (Groh *et al.*, 2002; Lenzian, 2006; Wunderling *et al.*, 2018), portanto o aumento da espessura deste tecido nas mudas inoculadas pode evitar infecções e evitar a perda

de água das raízes em solo com baixa disponibilidade hídrica. As BAs podem aumentar a tolerância das plantas a estresses bióticos e abióticos por uma série de mecanismos (Bashan e de-Bashan, 2002; Liu *et al.*, 2009; Rodríguez-Salazar *et al.*, 2009; Park *et al.*, 2017; Radhakrishnan *et al.*, 2017; Fukami *et al.*, 2018a), entretanto poucos estudos demonstram alterações anatômicas em plantas inoculadas com microrganismos (por exemplo, Romero *et al.*, 2014; Paradiso *et al.*, 2017). Os resultados encontrados para as mudas destas duas espécies arbóreas neotropicais, *H. courbaril* e *B. forficata*, demonstram que estas bactérias podem estimular diferentes padrões anatômicos que podem contribuir para a maior tolerância a estresses.

As raízes das mudas de *H. courbaril* inoculadas com ZK apresentaram maior área do cilindro vascular, o que indica maior área de tecidos condutores e pode aumentar a condutividade hidráulica destas. Romero *et al.*, 2014 observaram que a inoculação com *Azospirillum brasilense* em plantas de tomate aumentou a área dos vasos do xilema no caule, e levou à maior condutividade hidráulica das folhas em plantas infectadas por uma bactéria patogênica. As plantas inoculadas tiveram os efeitos da doença amenizados possivelmente devido à alteração nos vasos do xilema, já que a bactéria patogênica impede o fluxo de água neste tecido (Romero *et al.*, 2014). O aumento da condutividade hidráulica das raízes pode ser importante para as mudas de *H. courbaril*, e pode evitar que haja interrupção do fluxo de água das raízes para as folhas. As mudas inoculadas com ZK em DH tiveram menor redução do  $\Psi_w$  das folhas, indicando que não estavam sujeitas a embolia (Brodrigg *et al.* 2003).

Já nas mudas de *B. forficata* inoculadas com ZK, a inoculação diminuiu a ACV, além de diminuir a espessura tanto do xilema quanto do floema secundário, o que resultou na menor espessura total da raiz. Considerando as mudas submetidas ao DH, as mudas inoculadas com ZK não tiveram o  $\Psi_w$  das folhas mais negativo que das mudas NIn DH, o que sugere que a menor ACV e menor espessura do xilema causadas pela inoculação com ZK não comprometeu a condutividade hidráulica das raízes até as folhas em relação às NIn e às mudas com Ab-V5 (Anderegg *et al.*, 2016; Oliveira *et al.*, 2018). Entretanto, é possível que estas mudas tenham menor área de vasos do xilema, já que a frequência de vasos na ACV não foi afetada (dados não apresentados).

A diminuição da espessura do córtex nas mudas de *H. courbaril* inoculadas

com ambas as estirpes pode indicar consumo de carboidratos de reserva. As plantas exsudam compostos do metabolismo primário como açúcares, aminoácidos e ácidos orgânicos, que podem ser utilizados por microrganismos na rizosfera (Canarini *et al.*, 2019; Rondina *et al.*, 2019) e podem estimular a proliferação de microrganismos benéficos (de Graaff *et al.*, 2010; Kuzyakov e Blagodatskaya, 2015; Rondina *et al.*, 2019). A inoculação destas mudas pode ter aumentado o efeito de dreno da rizosfera em relação aos exsudatos das raízes, o que pode ter resultado no consumo de reservas pela própria planta para manutenção do seu metabolismo. Apesar das bactérias consumirem compostos do metabolismo primário das plantas, as últimas podem ser favorecidas com maior disponibilidade de nutrientes como N, P, K, Ca e Mg pelas bactérias (Sheng e He, 2006; Hungria *et al.*, 2010; Rondina *et al.*, 2019). Os exsudatos da raiz podem ser importantes também para o estabelecimento da associação entre a planta e a bactéria. Al-ali *et al.* (2018) verificaram que a exsudação de metabólitos primários na rizosfera de plantas de tomate estimulou a produção de biofilme por *Bacillus velezensis* FZB42, e a formação de biofilme foi essencial para o sucesso da associação entre a planta e a bactéria.

### 1.5. CONCLUSÕES

A inoculação com as bactérias associativas estimulou respostas de tolerância ao déficit hídrico das mudas de *Hymenaea courbaril* e *Bauhinia forficata*. Desse modo, mudas inoculadas com ZK ou com Ab-V5 podem ter maior chance de estabelecimento, crescimento e sobrevivência no campo. As respostas observadas indicam que a inoculação com bactérias associativas tem potencial aplicação no cultivo de mudas arbóreas neotropicais em viveiros e destinadas ao plantio em locais sujeitos à restrição hídrica, o que é frequente em áreas em início de sucessão secundária, como ocorre em sítios de reflorestamento.

A inoculação teve efeitos diferentes nas mudas destas duas espécies, sendo que em *H. courbaril*, a inoculação com ZK melhorou as relações hídricas da muda, aumentando o  $\Psi_w$  foliar, além de ter influenciado positivamente no metabolismo do N, aumentando o conteúdo de proteínas foliares. As alterações anatômicas encontradas nas folhas desta espécie quando inoculada com ZK também podem contribuir para maior fotossíntese líquida. A inoculação com Ab-V5 também estimulou o metabolismo do N, aumentando a assimilação de  $\text{NO}_3^-$  nas folhas e, a

ambas as estirpes estimularam o acúmulo de prolina e o aumento da periderme das raízes, indicando uma maior proteção contra danos deste órgão. Já nas mudas de *B. forficata*, a inoculação com Ab-V5 permitiu manutenção da assimilação líquida de CO<sub>2</sub> em DH, além de diminuir a peroxidação lipídica nas folhas. A inoculação com ambas as estirpes aumentou a eficiência no uso da água e manteve a eficiência de carboxilação, e permitiu a manutenção da assimilação do NO<sub>3</sub><sup>-</sup> nas raízes. O aumento da periderme também foi observado nas mudas de *B. forficata*, indicando que a inoculação com estas bactérias associativas pode permitir maior proteção contra patógenos e desidratação.

### **Agradecimentos**

Os autores agradecem ao Programa de pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina (UEL), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela concessão de bolsa de estudo ao primeiro autor, ao Laboratório de Biodiversidade e Restauração de Ecossistemas da UEL por disponibilizarem as sementes utilizadas neste estudo, e ao Prof. André Martinez (Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, UEL) pelo fornecimento das estirpes bacterianas.

### **Financiamento**

Este estudo foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (445290/2014-5). O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

### **Conflito de interesses**

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

### **Contribuições dos autores**

RSM e JAP conceberam o estudo e planejaram o delineamento experimental. MFH

adquiriu, analisou e interpretou os dados. MFH, RSM e JAP escreveram e revisaram criticamente o manuscrito e o aprovaram para ser submetido.

## REFERÊNCIAS

- Al-Ali, A., Derauel, J., Krier, F., Béchet, M., Ongena, M., Jacques, P., 2018. Biofilm formation is determinant in tomato rhizosphere colonization by *Bacillus velezensis* FZB42. *Environmental Science and Pollution Research* 25, 29910-29920.
- Alia, Saradhi, P.P., Mohanty, P., 1997. Involvement of proline in protecting thylakoid membranes against free radical-induced photodamage. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 38, 253-257.
- Anderegg, W.R.L., Klein, T., Bartlett, M., Sack, L., Pellegrini, A.F.A., Choat, B., Jansen, S., 2016. Meta-analysis reveals that hydraulic traits explain cross-species patterns of drought-induced tree mortality across the globe. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 113, 5024–5029.
- Armada, E., Leite, M.F.A., Medina, A., Azcón, R., Kuramae, E.E., 2018. Native bacteria promote plant growth under drought stress condition without impacting the rhizomicrobiome. *FEMS Microbiology Ecology* 94, fiy092.
- Asquith, N.M., Terborgh, J., Arnold, A.E., Riveros, C.M., 1999. The fruits the agouti ate: *Hymenaea courbaril* seed fate when its disperser is absent. *Journal of Tropical Ecology* 15, 229-235.
- Assman, S.M., 2003. *OPEN STOMATA1* opens the door to ABA signaling in *Arabidopsis* guard cells. *Trends in Plant Science* 8, 151-153.
- Baldani, V.L.D., Baldani, J.I., Döbereiner, J., 1986. Establishment of inoculated *Azospirillum* spp. in the rhizosphere and in roots of field grown wheat and sorghum. *Plant and Soil* 90, 35-46.
- Bashan, Y., de-Bashan, L.E., 2002. Protection of tomato seedlings against infection by *Pseudomonas syringae* pv. tomato by using the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 2637–2643.
- Bashan, Y., Salazar, B.G., Moreno, M., Lopez, B.R., Linderman, R.G., 2012. Restoration of eroded soil in the Sonoran Desert with native leguminous trees using plant growth-promoting microorganisms and limited amounts of compost and water. *Journal of Environmental Management* 102, 26-36.
- Belimov, A.A., Kunakova, A.M., Safronova, V.I., Stepanok, V.V., Yudkin, L.Y., Alekseev, Y.V., Khozhemyakov, A.P., 2004. Employment of rhizobacteria for the inoculation of barley plants cultivated in soil contaminated with lead and cadmium. *Microbiology* 73, 99-106.
- Bezerra, G.B., Góis, R.W.S., Brito, T.S., Lima, F.J.B., Bandeira, M.A.M., Romero, N.R., Magalhães, P.J.C., Santiago, G.M.P., 2013. Phytochemical study guided by the myorelaxant activity of the crude extract, fractions and constituent from stem bark of *Hymenaea courbaril* L. *Journal of Ethnopharmacology* 149, 62-69.
- Bloom, A.J., 2015. Photorespiration and nitrate assimilation: a major intersection between plant carbon and nitrogen. *Photosynthesis Research* 123, 117-128.
- Bloom, A.J., Smart, D.R., Nguyen, D.T., Searles, P.S., 2002. Nitrogen assimilation and growth of wheat under elevated carbon dioxide. *PNAS* 9, 1730-1735.

- Bloom, A.J., Burger, M., Asensio, J.S.R., Cousins, A.B., 2010. Carbon dioxide enrichment inhibits nitrate assimilation in wheat and *Arabidopsis*. *Science* 328, 899–903.
- Bowne, J.B., Erwin, T.A., Juttner, J., Schnurbusch, T., Langridge, P., Bacic, A., Roessner, U., 2012. Drought responses of leaf tissues from wheat cultivars of differing drought tolerance at the metabolite level. *Molecular Plant* 5, 418-429.
- 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.
- Bray, E.A., 1997. Plant responses to water deficit. *Trends in Plant Science* 2, 48-54.
- Brodribb, T.J., Holbrook, N.M., Edwards, E.J., Gutiérrez, M.V., 2003. Relations between stomatal closure, leaf turgor and xylem vulnerability in eight tropical dry forest trees. *Plant, Cell and Environment* 26, 443-450.
- Brunner, I., Herzog, C., Dawes, M.A., Arend, M., Sperisen, C., 2015. How tree roots respond to drought. *Frontiers in Plant Science* 6, 547.
- Camejo, G., Wallin, B., Enojärvi, M., 1998. Analyses of oxidation and antioxidants using microtiter plates. In: Armstrong, D. (Ed.), *Free Radical and Antioxidants Protocols*. Humana Press, Molndal, 377–387.
- Canarini, A., Kaiser, C., Merchant, A., Richter, A., Wanek, W., 2019. Root exudation of primary metabolites: mechanisms and their roles in plant responses to environmental stimuli. *Frontiers in Plant Science* 10, 157.
- Carillo, P., Mastrodonato, G., Nacca, F., Parisi, D., Verlotto, A., Fuggi, A., 2008. Nitrogen metabolism in durum wheat under salinity: accumulation of proline and glycine betaine. *Functional Plant Biology* 35, 412-426.
- Carvalho, M.H.C., 2008. Drought stress and reactive oxygen species: production, scavenging and signaling. *Plant Signaling & Behavior* 3, 156-165.
- Chaves, M.M., Pereira, J.S., Maroco, J., Rodrigues, M.L., Ricardo, C.P.P., Osório, M.L., Carvalho, I., Faria, T., Pinheiro, C., 2002. How plants cope with water stress in the field. Photosynthesis and growth. *Annals of Botany* 89, 907-916.
- Chaves, M.M., Flexas, J., Pinheiro, C., 2009. Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Annals of Botany* 103, 551-560.
- Chazdon, R.L., Coe, F.G., 1999. Ethnobotany of woody species in second-growth, old-growth, and selectively logged forests of northeastern Costa Rica. *Conservation Biology* 13, 1312-1322.
- Cohen, A., Bottini, R., Pontin, M., Berli, F., Moreno, D., Boccanlandro, H., Travaglia, C., Picocoli, P., 2015. *Azospirillum brasilense* ameliorates the response of *Arabidopsis thaliana* to drought mainly via enhancement of ABA levels. *Physiologia Plantarum* 153, 79–90.
- Colombo, A.F., Joly, C.A., 2010. Brazilian Atlantic Forest lato sensu: the most ancient Brazilian forest, and a biodiversity hotspot, is highly threatened by climate change. *Brazilian Journal of Biology* 70, 697-708.
- Correia, M.J., Fonseca, F., Azedo-Silva, J., Dias, C., David, M.M., Barrote, I., Osório, M.L., Osório, J., 2005. Effects of water deficit on the activity of nitrate reductase and content of sugars, nitrate and free amino acids in the leaves and roots of sunflower and white lupin plants growing under two nutrient supply regimes. *Physiologia Plantarum* 124, 61-70.
- Crang, R., Lyons-Sobaski, S., Wise, R., 2018. Leaves. In: *Plant Anatomy*. Springer, Cham, pp 395-441.

- 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. *Forest Ecology and Management*. 261, 1643-1653.
- Cunningham, S.C., Mac Nally, R., Baker, P.J., Cavagnaro, T.R., Beringer, J., Thomson, J.R., Thompson, R.M., 2015. Balancing the environmental benefits of reforestation in agricultural regions. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 17, 301-317.
- de Graaff, M.A., Classen, A.T., Castro, H.F., Schadt, C.W., 2010. Labile soil carbon inputs mediate the soil microbial community composition and plant residue decomposition rates. *New Phytologist* 188, 1055–1064.
- Desikan, R., Cheung, M.K., Bright, J., Henson, D., Hancock, J.T., Neill, S.J., 2004. ABA, hydrogen peroxide and nitric oxide signalling in stomatal guard cells. *Journal of Experimental Botany* 55, 205-212.
- Diabate, M., Munive, A., Faria, S.M., Ba, A., Dreyfus, B., Galiana, A., 2005. Occurrence of nodulation in unexplored leguminous trees native to the West African rain forest – Application to rhizobial inoculation of native species. *New Phytologist* 166, 231-239.
- Dunlap, C.A., Kim, S.J., Kwon, S.W., Rooney, A.P., 2016. *Bacillus velezensis* is not a later heterotypic synonym of *Bacillus amyloliquefaciens*; *Bacillus methylotrophicus*, *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* and '*Bacillus oryzicola*' are later heterotypic synonyms of *Bacillus velezensis* based on phylogenomics. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 66, 1212-1217.
- El-Komy, H.M., Hamdia, M.A., ABD El-Baki, G.K., 2003. Nitrate reductase in wheat plants grown under water stress and inoculated with *Azospirillum* spp. *Biologia Plantarum* 46, 281-287.
- Ellis, R.J., 1979. The most abundant protein in the world. *Trends in Biochemical Science* 4, 241-244.
- Ellison, D., Morris, C.E., Locatelli, B., Sheil, D., Cohen, J., Murdiyarso, D., Gutierrez, V., vanNoordwijk, M., Creed, I.F., Pokorny, J., Gaveau, D., Spracklen, D.V., Tobella, A.B., Ilstedt, U., Teuling, A.J., *et al.*, 2017. Trees, forests and water: Cool insights for a hot world. *Global Environment Change* 43, 51-61.
- Estes, B.L., Enebak, S.A., Chappelka, A.H., 2004. Loblolly pine seedling growth after inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria and ozone exposure. *Canadian Journal of Forest Research* 34, 1410-1416.
- Faria, S.M., Lima, H.C., 1998. Additional studies of the nodulation status of legume species in Brazil. *Plant and Soil* 200, 185–192.
- Flexas, J., Bota, J., Escalona, J.M., Sampol, B., Medrano, H., 2002. Effects of drought on photosynthesis in grapevines under field conditions: an evaluation of stomatal and mesophyll limitations. *Functional Plant Biology* 29, 461-471.
- Flexas, J., Bota, J., Loreto, F., Cornic, G., Sharkey, T.D., 2004. Diffusive and metabolic limitations to photosynthesis under drought and salinity in C<sub>3</sub> plants. *Plant Biology* 6, 269-279.
- Foyer, C.H., Valadier, M.H., Migge, A., Becker, T.A., 1998. Drought-induced effects on nitrate reductase activity and mRNA and on the coordination of nitrogen and carbon metabolism in maize leaves. *Plant Physiology* 117, 283-292.
- Fresneau, C., Ghashgaie, J., Cornic, G., 2007. Drought effect on nitrate reductase and sucrose-phosphate synthase activities in wheat (*Triticum durum* L.): role of leaf internal CO<sub>2</sub>. *Journal of Experimental Botany* 58, 2983-2992.

- Fukami, J., Ollero, F.C., Megías, M., Hungria, M., 2017. Phytohormones and induction of plant-stress tolerance and defense genes by seed and foliar inoculation with *Azospirillum brasilense* cells and metabolites promote maize growth. *AMB Express* 7, 153.
- Fukami, J., Cerezini, P., Hungria, M., 2018a. *Azospirillum*: benefits that go far beyond biological nitrogen fixation. *AMB Expr.* 8, 73-85.
- Fukami, J., de la Osa, C., Ollero, F.J., Megías, M., Hungria, M. 2018b. Co-inoculation of maize with *Azospirillum brasilense* and *Rhizobium tropici* as a strategy to mitigate salinity stress. *Functional Plant Biology* 45, 328-339.
- Frioni, L., Doderá, R., Malatés, D., Irigoyen, I., 1998. An assessment of nitrogen fixation capability of leguminous trees in Uruguay. *Applied Soil Ecology* 7, 271-279.
- García de Salomone, I., Döbereiner, J., 1996. Maize genotype effects on the response to *Azospirillum* inoculation. *Biology and Fertility of Soils* 21, 193-196.
- Garg, B.K., Kathju, S., Burman, U., 2001. Influence of water stress on water relations, photosynthetic parameters and nitrogen metabolism of moth bean genotypes. *Biologia Plantarum* 44, 289-292.
- Goes, K.C.G.P., Fisher, M.L.C., Cattelan, A.J., Nogueira, M.A., Carvalho, C.G.P., Oliveira, A.L.M., 2012. Biochemical and molecular characterization of high population density bacteria isolated from sunflower. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 22, 437-447.
- Groh, B., Hubner, C., Lenzian, K.J., 2002. Water and oxygen permeance of phellem isolated from trees: the role of waxes and lenticels. *Planta* 215, 794-801.
- Grover, M., Madhubala, R., Ali, S.Z., Yadav, S.K., Venkatesvarlu, B. 2013. Influence of *Bacillus* spp. strains on seedling growth and physiological parameters of sorghum under moisture stress conditions. *Journal of Basic Microbiology* 54, 951-961.
- Hemaprabha, G., Swapna, S., Lavanya, D.L., Sajita, B., Venkataramana, S., 2013. Evaluation of Drought Tolerance Potential of Elite Genotypes and Progenies of Sugarcane (*Saccharum* sp. hybrids). *Sugar Tech* 15, 9-16.
- Henry, C., John, G.P., Pan, R., Bartlett, M.K., Fletcher, L.R., Scoffoni, C., Sack, L., 2019. A stomatal safety-efficiency trade-off constrains responses to leaf dehydration. *Nature Communications* 10, 3398.
- Hungria, M., Campo, R.J., Souza, E.M., Pedrosa, F.O., 2010. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. *Plant Soil* 331, 413-425.
- IAPAR, 2016. Agrometeorologia – Dados diários de Londrina. <http://www.iapar.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=2236> (acessado em Janeiro de 2020).
- Karajila, E., Selović, A., 2018. The effect of hydro and proline seed priming on growth, proline and sugar content, and antioxidant activity of maize under cadmium stress. *Environmental Science and Pollution Research* 25, 33370-33380.
- Kraus J.E., Arduim M., 1997. Manual básico de métodos em morfologia vegetal. Seropédica - Edur, Rio de Janeiro, 198 pp.
- Kuzyakov, Y., Blagodatskaya, E., 2015. Microbial hotspots and hot moments in soil: concept and review. *Soil Biology and Biochemistry* 83, 184-199.
- Lenzian, K.J., 2006. Survival strategies of plants during secondary growth: barrier properties of phellem and lenticels towards water, oxygen, and carbon dioxide. *Journal of Experimental Botany* 57, 2535-2546.

- Li, Y., Xu, S., Gao, J., Pan, S., Wang, G., 2016. *Bacillus subtilis*-regulation of stomatal movement and instantaneous water use efficiency in *Vicia faba*. *Plant Growth Regulation* 78, 43-55.
- Lima, H.C., Fortuna-Perez, A.P., Tozzi, A.M.G.A., Flores, A.S., Vaz, A.M.S.F., Klitgaard, B.B., Cardoso, D.B.O.S., Filardi, F.L., Garcia, F.C.P., Lewis, G. P., Iganci, J.R.V., Meireles, J.E., Valls, J.F.M., Lima, L.C.P., Queiroz, L.P., Silva, M.J., Morim, M.P., Barros, M.J.F., Queiroz, R.T., Fortunato, R.H., Pennington, R.T., Miotto, S.T.S., Moura, T.N., Dutra, V. F., Mansano, V., Souza, V.C., Scaloni, V.C., 2009. In Fabaceae-Leguminosae (J.R. Stehmann, R.C. Forzza, A. Salino, M. Sobral, D.P. Costa, L.H.Y. Kamino, Orgs.). *Plantas Da Floresta Atlântica. Jardim Botânico Do Rio De Janeiro, Rio De Janeiro*, pp.259-283.
- Liu, B., Qiao, H., Huang, L., Buchenauer, H., Han, Q., Kang, Z., Gong, Y., 2009. Biological control of take-all in wheat by endophytic *Bacillus subtilis* E1R-j and potential mode of action. *Biological Control* 49, 277-285.
- Liu, F., Xing, S., Ma, H., Du, Z., Ma, B., 2013. Cytokinin-producing, plant growth-promoting rhizobacteria that confer resistance to drought stress in *Platyclusus orientalis* container seedlings. *Applied Microbial and Cell Physiology* 97, 9155-9164.
- Locosselli, G.M., Krottenthaler, S., Pitsch, P., Anhof, D., Ceccantini, G., 2017. Age and growth rate of congeneric tree species (*Hymenaea* spp. - Leguminosae) inhabiting different tropical biomes. *Erdkunde* 71, 45-57.
- Kim, J., Malladi, A., van Iersel, M.W., 2012. Physiological and molecular responses to drought in *Petunia*: the importance of stress severity. *Journal of Experimental Botany* 63, 6335-6345.
- McCullough, H., 1967. The determination of ammonia in whole blood by a direct colorimetric method. *Clinica Chimica Acta* 17, 297-304.
- Miranda, K.M., Espey, M.G., Wink, D.A., 2001. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide* 5, 62-71.
- Miyake, M., Sasaki, K., Ide, K., Matsukura, Y., Shijima, K., Fujiwara, D., 2006. Highly Oligomeric Procyanidins Ameliorate Experimental Autoimmune Encephalomyelitis via Suppression of Th1 Immunity. *The Journal of Immunology* 176, 5797-5804.
- Moreira, F.M.S., Silva, M.S., Faria, S.M., 1992. Occurrence of nodulation in legume species in the Amazon region of Brazil. *New Phytologist* 121, 563-570.
- Munné-Bosch, S., Alegre, L., 2004. Die and let live: leaf senescence contributes to plant survival under drought stress. *Functional Plant Biology* 31, 203-216.
- Noctor, G., Veljovic-Jovanovic, S., Driscoll, S., Novitskaya, L., Foyer, C.H., 2002. Drought and Oxidative Load in the Leaves of C<sub>3</sub> Plants: a Predominant Role for Photorespiration? *Annals of Botany* 89, 841-850.
- Oliveira, A.L.M., Santos, O.J.A.P., Marcelino, P.R.F., Milani, K.M.L., Zuluaga, M.Y.A., Zucareli, C., Gonçalves, L.S.A., 2017. Maize inoculation with *Azospirillum brasilense* Ab-V5 cells enriched with exopolysaccharides and polyhydroxybutyrate results in high productivity under low N fertilizer input. *Frontiers in Microbiology* 8, 1–18.
- Oliveira, H.C., Sodek, L., 2013. Effect of oxygen deficiency on nitrogen assimilation and amino acid metabolism by soybean root segments. *Amino Acids* 44, 743-755.
- Oliveira, R.S., Costa, F.R.C., van Baalen, E., de Jonge, A., Bittencourt, P.R., Almanza, Y., Barros, F.V., Cordoba, E.C., Fagundes, M.V., Garcia, S., Guimaraes, Z.T.M., Hertel, M., Schietti, J., Rodrigues-Souza, J., Poorter, L., 2018. Embolism resistance drives the distribution of Amazonian rainforest tree species along hydro-topographic gradients. *New Phytologist* 221, 1457-1465.

- Omar, M.N.A., Osman, M.E.H., Kasim, W.A., El-Daim, I.A.A., 2009. In Improvement of salt tolerance mechanisms of barley cultivated under salt stress using *Azospirillum brasilense*. (M. Ashraf, M. Ozturk, H.R. Athar, Eds). Salinity and Water Stress. Springer, Dordrecht, P.133–147.
- Osório, J., Osório, M.L., Chaves, M.M., Pereira, J.S., 1998. Water deficits are more importante in delaying growth than in changing patterns of carbon allocation in *Eucalyptus globulus*. Tree Physiology 18, 363-373.
- Paradiso, R., Arena, C., De Micco, V., Giordano, M., Aronne, G., De Pascale, S., 2017. Changes in leaf anatomical traits enhanced photosynthetic activity of soybean grown in hydroponics with plant growth-promoting microorganisms. Frontiers in Plant Science 8, 674.
- Park, Y.G., Mun, B.G., Kang, S.M., Hussain, A., Shahzad, R., Seo, C.W., Kim, A.Y., Lee, S.U., Oh, K.Y., Lee, D.Y., Lee, I.J., Yun, B.W., 2017. *Bacillus aryabhatai* SRB02 tolerates oxidative and nitrosative stress and promotes the growth of soybean by modulating the production of phytohormones. Plos One 12, e0173203.
- Parry, M.A.J., Andralojc, P.J., Mitchell, R.A.C., Madgwick, P.J., Keys, A.J., 2003. Manipulation of Rubisco: the amount, activity, function and regulation. Journal of Experimental Botany 54, 1321–1333.
- Pepato, M.T., Keller, E.H., Baviera, A.M., Kettelhut, I.C., Vendramini, R.C., Brunetti, I.L., 2005. Anti-diabetic activity of *Bauhinia forficata* decoction in streptozotocin-diabetic rats. Journal of Ethnopharmacology 81, 191-197.
- Radhakrishnan, R., Hashem, A., Abd-Allah, E.F., 2017. *Bacillus*: A Biological Tool for Crop Improvement through Bio-Molecular Changes in Adverse Environments. Frontiers in Physiology 8, 667.
- Rathnam, C.K.M., 1978. Malate and dihydroxyacetone phosphate-dependent nitrate reduction in spinach leaf protoplasts. Plant Physiology 62, 220–223.
- Reis, V.M.R., Teixeira, K., 2005. Fixação Biológica de Nitrogênio: estado da arte. In: Aquino, A.M.; Assis, R.L. (Ed.). Agroecologia: princípios e técnicas para uma agricultura orgânica sustentável. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica. Cap. 6, p. 151-180.
- Rincón, A., Valladares, F., Gimeno, T.E., Pueyo, J.J., 2008. Water stress responses of two Mediterranean tree species influenced by native soil microorganisms and inoculation with a plant growth promoting rhizobacterium. Tree Physiology 28, 1693-1701.
- Rodríguez-Salazar, J., Suárez, R., Caballero-Mellado, J., Iturriaga, G., 2009. Trehalose accumulation in *Azospirillum brasilense* improves drought tolerance and biomass in maize plants. FEMS Microbiology Letters 296, 52–59.
- Romero, A.M., Vega, D., Correa, O.S., 2014. *Azospirillum brasilense* mitigates water stress imposed by a vascular disease by increasing xylem vessel area and stem hydraulic conductivity in tomato. Applied Soil Ecology 82, 38-43.
- Rondina, A.B.L., Tonon, B.C., Lescano, L.E.A.M., Hungria, M., Nogueira, M.A., Zangaro, W., 2019. Plants of distinct successional stages have different strategies for nutrient acquisition in an Atlantic rain forest ecosystem. International Journal of Plant Sciences 180, 186-199.
- Ruiz-García, C., Béjar, V., Martínez-Checa, F., Llamas, I., Quesada, E., 2005. *Bacillus velezensis* sp. nov., a surfactant producing bacterium isolated from the river Vélez in Málaga, southern Spain. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 55, 191–195.

- Sandhya, V., Ali, S.Z., Grover, M., Reddy, G., Venkateswarlu, B., 2010. Effect of plant growth promoting *Pseudomonas* spp. on compatible solutes, antioxidant status and plant growth of maize under drought stress. *Plant Growth Regul.* 62, 21–30.
- Scholander, P.F., Hammel, H.T., Bradstreet, E.D., Hemmingsen, E.A., 1965. Sap Pressure in Vascular Plants. *Science* 148, 339-346.
- Sheng, X.F., He, L.Y., 2006. Solubilization of potassium-bearing minerals by a wild-type strain of *Bacillus edaphicus* and its mutants and increased potassium uptake by wheat. *Canadian Journal of Microbiology* 52, 66–72.
- 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. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 22, 245-254.
- Silva, F.C., Soares-Silva, L.H., 2000. Arboreal Flora of the Godoy Forest State Park, Londrina, PR. Brazil. *Edinb. J. Bot.* 57, 107-120.
- Silva, J.R., Gastauer, M., Ramos, S.J., Mitre, S.K., Neto, A.E.F., Siqueira, J.O., Caldeira, C.F., 2018. Initial growth of Fabaceae species: Combined effects of topsoil and fertilizer application for mineland revegetation. *Flora* 246-247, 109-117.
- Stewart, G.R., Popp, M., Holzappel, I., Stewart, J.A., Dickie-Eskew, A., 1986. Localization of nitrate reduction in ferns and its relationship to environment and physiological characteristics. *New Phytologist* 104, 373–384.
- Szabados, L., Savouré, A., 2009. Proline: a multifunctional amino acid. *Trends in Plant Science* 15, 89-97.
- Taniguchi, M., Miyake, H., 2012. Redox-shuttling between chloroplast and cytosol: Integration of intra-chloroplast and extra-chloroplast metabolism. *Current Opinion in Plant Biology* 15, 252–260.
- Tiepo, A.N., Hertel, M.F., Rocha, S.S., Calzavara, A.K., Oliveira, A.L.M., Pimenta, J.A., Oliveira, H.C., Bianchini, E., Stolf-Moreira, R., 2018. Enhanced drought tolerance in seedlings of Neotropical tree species inoculated with plant growth-promoting bacteria. *Plant Physiology and Biochemistry* 130, 277-288.
- Tischner, R., 2000. Nitrate uptake and reduction in higher and lower plants. *Plant, Cell and Environment* 23, 1005–1024.
- Tomás, M., Flexas, J., Copolovici, L., Galmés, J., Hallik, L., Medrano, H., Ribas-Carbó, M., Tosens, T., Vislap, V., Niinemets, Ü., 2013. Importance of leaf anatomy in determining mesophyll diffusion conductance to CO<sub>2</sub> across species: quantitative limitations and scaling up by models. *Journal of Experimental Botany* 64, 2269-2281.
- Trenberth, K.E., Dai, A., van der Schrier, G., Jones, P.D., Barichivich, J., Briffa, K.R., Sheffield, J., 2013. Global warming and changes in drought. *Nature Climate Change* 4, 17-22.
- Vardharajula, S., Ali, S.Z., Grover, M., Reddy, G., Bandi, V., 2011. Drought-tolerant plant growth promoting *Bacillus* spp.: effect on growth, osmolytes and antioxidant status of maize under drought stress. *J. of Plant Interactions* 6, 1-14.
- Vogelmann, T.C., Nishio, J.N., Smith, W.K., 1996. Leaves and light capture: light propagation and gradients of carbon fixation within leaves. *Trends in Plant Science* 1, 65-70.
- Wilkinson, S., Davies, W.J., 2002. ABA-based chemical signalling: the co-ordination of responses to stress in plants. *Plant, Cell and Environment* 25, 195-210.
- Wunderling, A., Ripper, D., Barra-Jimenez, A., Mahn, S., Sajak, K., Targem, M.B., Ragni, L., 2018. A molecular framework to study periderm formation in *Arabidopsis*. *New Phytologist* 219, 216-229.

- Yemm, E.W., Cocking, E.C., 1955. The determination of amino acid with ninhydrin. *Analyst* 80, 209-213.
- Zhang, J., Davies, W.J., 1990. Changes in the concentration of ABA in xylem sap as a function of changing soil water status can account for changes in leaf conductance and growth. *Plant, Cell and Environment* 13, 277-285.
- Zhang, W., Xie, Z., Zhang, X., Lang, D., Zhang, X., 2019. Growth-promoting bacteria alleviates drought stress of *G. uralensis* through improving photosynthesis characteristics and water status. *Journal of Plant Interactions* 14, 580-589.

**Apêndice 1.** Teste F (valor de P) para contrastes entre tratamentos de mudas de *Hymenaea courbaril* (n = 10). Os contrastes foram ortogonais e previamente estabelecidos. CC: Capacidade de campo; DH: Déficit hídrico; NIn: mudas não inoculadas com bactérias associativas; ZK: mudas associadas a *Bacillus velezensis*; Ab-V5: mudas associadas a *Azospirillum brasilense*.  $A_{max}$ : assimilação líquida de CO<sub>2</sub> ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ );  $g_s$ : condutância estomática ( $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ );  $E$ : transpiração ( $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ );  $EUA_i$ : eficiência intrínseca no uso da água ( $\mu\text{molCO}_2 \text{ molH}_2\text{O}^{-1}$ );  $C_i/C_a$ : razão concentração intercelular/concentração no ambiente de CO<sub>2</sub>;  $k$ : eficiência instantânea de carboxilação ( $\mu\text{molCO}_2 \text{ m}^{-2} \text{s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$ ).

Contrastes		$A_{max}$	$g_s$	$E$	$EUA$	$C_i/C_a$	$k$
		F(P)					
<b>A</b>	(CC NIn) vs (DH NIn)	3,44 (0,0692)	36,98 (0,0000)	21,24 (0,0000)	17,15 (0,0001)	51,52 (0,0000)	5,57 (0,022)
<b>B</b>	(CC NIn) vs (DH ZK)	21,95 (0,0000)	68,81 (0,0000)	82,3 (0,0000)	112,1 (0,0000)	119,9 (0,0000)	6,41 (0,0143)
<b>C</b>	(CC NIn) vs (DH Ab-V5)	33,34 (0,0000)	65,86 (0,0000)	41,56 (0,0000)	5,46 (0,0232)	76,89 (0,0000)	0,449 (0,5057)
<b>D</b>	(DH NIn) vs (DH ZK)	8,01 (0,0065)	4,9 (0,0311)	19,92 (0,0000)	41,57 (0,0000)	14,22 (0,0004)	0,03 (0,8642)
<b>E</b>	(DH NIn) vs (DH Ab-V5)	15,37 (0,0003)	4,14 (0,0469)	3,38 (0,0715)	3,26 (0,0767)	2,53 (0,1174)	9,18 (0,0038)

**Apêndice 2.** Teste F (valor de P) para contrastes entre tratamentos de mudas de *Hymenaea courbaril* (n = 5). Os contrastes foram ortogonais e previamente estabelecidos. CC: Capacidade de campo; DH: Déficit hídrico; NIn: mudas não inoculadas com bactérias associativas; ZK: mudas associadas a *Bacillus velezensis*; Ab-V5: mudas associadas a *Azospirillum brasilense*.  $\Psi_w$ : potencial hídrico (Mpa); Prolina ( $\mu\text{mol g}^{-1}\text{MS}$  folha);  $\text{H}_2\text{O}_2$ : peróxido de hidrogênio ( $\mu\text{mol g}^{-1}\text{MS}$  folha); MDA: malondialdeído ( $\text{nmol g}^{-1}\text{MS}$  folha).

Contrastes		$\Psi_w$	Prolina	$\text{H}_2\text{O}_2$	MDA
		F(P)			
<b>A</b>	(CC NIn) vs (DH NIn)	128,8 ( <b>0,0000</b> )	1,72 (0,2025)	0,35 (0,5594)	0,101 (0,753)
<b>B</b>	(CC NIn) vs (DH ZK)	15,83 ( <b>0,0006</b> )	9,47 ( <b>0,0052</b> )	0,004 (0,951)	5,91 ( <b>0,0229</b> )
<b>C</b>	(CC NIn) vs (DH Ab-V5)	92 ( <b>0,0000</b> )	6,68 ( <b>0,0163</b> )	3,04 (0,0942)	20,02 ( <b>0,0002</b> )
<b>D</b>	(DH NIn) vs (DH ZK)	54,34 ( <b>0,0000</b> )	3,12 (0,0899)	0,428 (0,5193)	4,46 ( <b>0,0452</b> )
<b>E</b>	(DH NIn) vs (DH Ab-V5)	3,09 (0,0914)	1,62 (0,2147)	5,45 ( <b>0,0282</b> )	17,27 ( <b>0,0004</b> )

**Apêndice 3.** Teste F (valor de P) para contrastes entre tratamentos de mudas de *Hymenaea courbaril* (n = 5). Os contrastes foram ortogonais e previamente estabelecidos. CC: Capacidade de campo; DH: Déficit hídrico; NIn: mudas não inoculadas com bactérias associativas; ZK: mudas associadas a *Bacillus velezensis*; Ab-V5: mudas associadas a *Azospirillum brasilense*. ANR: atividade da NR ( $\text{nmol min}^{-1} \text{g}^{-1}\text{MS}$ );  $\text{NO}_3^-$ : nitrato ( $\mu\text{mol g}^{-1}\text{MS}$ );  $\text{NH}_4^+$ : amônio ( $\mu\text{mol g}^{-1}\text{MS}$ ); aa: aminoácidos ( $\mu\text{mol g}^{-1}\text{MS}$ ); proteínas solúveis ( $\text{mg g}^{-1}\text{MS}$ ).

Contrastes		ANR folha	ANR raiz	$\text{NO}_3^-$ folha	$\text{NO}_3^-$ raiz	$\text{NH}_4^+$ folha	$\text{NH}_4^+$ raiz	aa folha	aa raiz	Proteínas folha	Proteínas raiz
<b>F(P)</b>											
<b>A</b>	(CC NIn) vs (DH NIn)	1,74 (0,1992)	22,9 <b>(0,0001)</b>	1,64 (0,212)	111 <b>(0,0000)</b>	0,41 (0,5279)	10,75 <b>(0,0032)</b>	13,81 <b>(0,0011)</b>	45,3 <b>(0,0000)</b>	4,26 <b>(0,0499)</b>	0,726 (0,4027)
<b>B</b>	(CC NIn) vs (DH ZK)	0,0001 (0,9905)	23,47 <b>(0,0001)</b>	3,53 (0,0724)	67,79 <b>(0,0000)</b>	0,013 (0,9103)	6,8 <b>(0,0154)</b>	16,93 <b>(0,0004)</b>	24,37 <b>(0,0000)</b>	0,116 (0,7366)	0,611 (0,4421)
<b>C</b>	(CC NIn) vs (DH Ab-V5)	0,58 (0,4537)	18,43 <b>(0,0003)</b>	4,14 (0,0532)	74,25 <b>(0,0000)</b>	1,54 (0,227)	19,22 <b>(0,0002)</b>	31,1 <b>(0,0000)</b>	34,54 <b>(0,0000)</b>	2,59 (0,1207)	1,67 (0,2084)
<b>D</b>	(DH NIn) vs (DH ZK)	1,78 (0,1952)	0,004 (0,9533)	0,356 (0,5563)	5,31 <b>(0,0302)</b>	0,569 (0,4579)	0,449 (0,509)	0,159 (0,6937)	3,22 (0,0854)	5,78 <b>(0,0243)</b>	2,67 (0,1154)
<b>E</b>	(DH NIn) vs (DH Ab-V5)	4,33 <b>(0,0482)</b>	0,242 (0,6272)	0,565 (0,4597)	3,69 (0,0668)	3,54 (0,0722)	1,22 (0,2797)	3,46 (0,0751)	0,729 (0,4016)	0,207 (0,6532)	0,194 (0,6633)

**Apêndice 4.** Teste F (valor de P) para contrastes entre tratamentos de mudas de *Hymenaea courbaril* (n = 10). Os contrastes foram ortogonais e previamente estabelecidos. CC: Capacidade de campo; DH: Déficit hídrico; NIn: mudas não inoculadas com bactérias associativas; ZK: mudas associadas a *Bacillus velezensis*; Ab-V5: mudas associadas a *Azospirillum brasilense*. MS raiz: massa seca da raiz (g), MS PA: massa seca da parte aérea (g), MS folhas (g), AF: área foliar total (cm<sup>2</sup>), FMF: fração da massa foliar (g g<sup>-1</sup>MS planta), RAF: razão da área foliar (cm<sup>2</sup> g<sup>-1</sup>MS planta), FMR: fração da massa da raiz (g g<sup>-1</sup>MS planta), R/PA: razão MS raiz/MS PA.

Contrastes		MS raiz	MS PA	MS folhas	AF	FMF	RAF	FMR	R/PA
		F(P)							
<b>A</b>	(CC NIn) vs (DH NIn)	17,3 (0,0001)	24,12 (0,0000)	14,02 (0,0004)	15,11 (0,0003)	0,084 (0,7734)	1,55 (0,2187)	0,037 (0,8492)	0,028 (0,867)
<b>B</b>	(CC NIn) vs (DH ZK)	17,01 (0,0001)	14,49 (0,0004)	9 (0,0041)	9,47 (0,0033)	0,058 (0,8107)	0,72 (0,3998)	1,09 (0,302)	0,893 (0,3488)
<b>C</b>	(CC NIn) vs (DH Ab-V5)	23,15 (0,0000)	17,84 (0,0001)	6,95 (0,0109)	6,4 (0,0144)	2,06 (0,157)	0,748 (0,3911)	2,15 (0,148)	1,81 (0,184)
<b>D</b>	(DH NIn) vs (DH ZK)	0,001 (0,9721)	1,22 (0,2739)	0,555 (0,4596)	0,654 (0,4223)	0,281 (0,5983)	0,157 (0,6939)	1,52 (0,223)	1,24 (0,27)
<b>E</b>	(DH NIn) vs (DH Ab-V5)	0,424 (0,5176)	0,474 (0,4942)	1,23 (0,273)	1,84 (0,1803)	2,98 (0,0903)	4,45 (0,0396)	2,75 (0,103)	2,29 (0,136)

**Apêndice 5.** Teste F (valor de P) para contrastes entre tratamentos de mudas de *Bauhinia forficata* (n = 12). Os contrastes foram ortogonais e previamente estabelecidos. CC: Capacidade de campo; DH: Déficit hídrico; NIn: mudas não inoculadas com bactérias associativas; ZK: mudas associadas a *Bacillus velezensis*; Ab-V5: mudas associadas a *Azospirillum brasilense*.  $A_{\max}$ : assimilação líquida de  $\text{CO}_2$  ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ );  $g_s$ : condutância estomática ( $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ );  $E$ : transpiração ( $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ );  $EUA$ : eficiência no uso da água ( $\mu\text{molCO}_2 \text{ mmolH}_2\text{O}^{-1}$ );  $C_i/C_a$ : razão concentração intercelular/concentração no ambiente de  $\text{CO}_2$ ;  $k$ : eficiência instantânea de carboxilação ( $\mu\text{molCO}_2 \text{ m}^{-2} \text{s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$ ).

Contrastes		$A_{\max}$	$g_s$	$E$	$EUA$	$C_i/C_a$	$k$
		F(P)					
<b>A</b>	(CC NIn) vs (DH NIn)	11,89 ( <b>0,0009</b> )	8,65 ( <b>0,0045</b> )	18,77 ( <b>0,0001</b> )	2,05 (0,1573)	7,29 ( <b>0,0088</b> )	4,49 ( <b>0,0378</b> )
<b>B</b>	(CC NIn) vs (DH ZK)	10,75 ( <b>0,0017</b> )	9,23 ( <b>0,0034</b> )	21,92 ( <b>0,0000</b> )	10,07 ( <b>0,0023</b> )	13,26 ( <b>0,0005</b> )	2,06 (0,1559)
<b>C</b>	(CC NIn) vs (DH Ab-V5)	3,53 (0,0648)	4,84 ( <b>0,0313</b> )	11,02 ( <b>0,0015</b> )	5,17 ( <b>0,0262</b> )	6,67 ( <b>0,012</b> )	0,143 (0,7065)
<b>D</b>	(DH NIn) vs (DH ZK)	0,029 (0,8662)	0,009 (0,9231)	0,122 (0,7278)	3,04 (0,0861)	0,886 (0,3499)	0,468 (0,4964)
<b>E</b>	(DH NIn) vs (DH Ab-V5)	2,47 (0,1211)	0,549 (0,4615)	1,03 (0,3149)	0,711 (0,4021)	0,014 (0,9072)	3,03 (0,0863)

**Apêndice 6.** Teste F (valor de P) para contrastes entre tratamentos de mudas de *Bauhinia forficata* (n = 5). Os contrastes foram ortogonais e previamente estabelecidos. CC: Capacidade de campo; DH: Déficit hídrico; NIn: mudas não inoculadas com bactérias associativas; ZK: mudas associadas a *Bacillus velezensis*; Ab-V5: mudas associadas a *Azospirillum brasilense*.  $\Psi_w$ : potencial hídrico (Mpa); Prolina ( $\mu\text{mol g}^{-1}\text{MS}$  folha);  $\text{H}_2\text{O}_2$ : peróxido de hidrogênio ( $\mu\text{mol g}^{-1}\text{MS}$  folha); MDA: malondialdeído ( $\text{nmol g}^{-1}\text{MS}$  folha).

Contrastes		$\Psi_w$	Prolina	$\text{H}_2\text{O}_2$	MDA
		F(P)			
<b>A</b>	(CC NIn) vs (DH NIn)	17,01 ( <b>0,0004</b> )	3,86 (0,061)	0,835 (0,3698)	1,09 (0,3065)
<b>B</b>	(CC NIn) vs (DH ZK)	18 ( <b>0,0003</b> )	1,49 (0,2346)	0,655 (0,4262)	2,24 (0,1476)
<b>C</b>	(CC NIn) vs (DH Ab-V5)	7,87 ( <b>0,0098</b> )	0,045 (0,8334)	0,686 (0,4155)	4,71 ( <b>0,0401</b> )
<b>D</b>	(DH NIn) vs (DH ZK)	0,014 (0,9072)	0,557 (0,4629)	0,011 (0,9176)	0,204 (0,6555)
<b>E</b>	(DH NIn) vs (DH Ab-V5)	1,74 (0,1993)	4,47 ( <b>0,0395</b> )	0,007 (0,9326)	1,27 (0,2717)

**Apêndice 7.** Teste F (valor de P) para contrastes entre tratamentos de mudas de *Bauhinia forficata* (n = 5). Os contrastes foram ortogonais e previamente estabelecidos. CC: Capacidade de campo; DH: Déficit hídrico; NIn: mudas não inoculadas com bactérias associativas; ZK: mudas associadas a *Bacillus velezensis*; Ab-V5: mudas associadas a *Azospirillum brasilense*. ANR: atividade da NR ( $\text{nmol min}^{-1} \text{g}^{-1}\text{MS}$ );  $\text{NO}_3^-$ : nitrato ( $\mu\text{mol g}^{-1}\text{MS}$ );  $\text{NH}_4^+$ : amônio ( $\mu\text{mol g}^{-1}\text{MS}$ ); aa: aminoácidos ( $\mu\text{mol g}^{-1}\text{MS}$ ); proteínas solúveis ( $\text{mg g}^{-1}\text{MS}$ ).

Contrastes		ANR	ANR	$\text{NO}_3^-$	$\text{NO}_3^-$	$\text{NH}_4^+$	$\text{NH}_4^+$	aa	aa	Proteínas	Proteínas
		folha	raiz	folha	raiz	folha	raiz	folha	raiz	folha	raiz
<b>F(P)</b>											
<b>A</b>	(CC NIn) vs (DH NIn)	18,38 <b>(0,0003)</b>	7,67 <b>(0,0107)</b>	4,78 <b>(0,0387)</b>	26,6 <b>(0,0000)</b>	5,79 <b>(0,0242)</b>	12,12 <b>(0,0019)</b>	49,72 <b>(0,0000)</b>	1,32 (0,2627)	0,85 (0,477)	0,714 (0,4064)
<b>B</b>	(CC NIn) vs (DH ZK)	7,02 <b>(0,014)</b>	3,23 (0,0848)	2,16 (0,1545)	0,086 (0,7717)	4,08 (0,0546)	11,74 <b>(0,0022)</b>	45,7 <b>(0,0000)</b>	2,19 (0,1522)	1,37 (0,253)	2,82 (0,1058)
<b>C</b>	(CC NIn) vs (DH Ab-V5)	12,66 <b>(0,0016)</b>	2,9 (0,1014)	0,014 (0,9079)	2,24 (0,1472)	0,642 (0,431)	9,64 <b>(0,0048)</b>	16,24 <b>(0,0005)</b>	0,001 (0,9707)	2,15 (0,1555)	0,036 (0,8519)
<b>D</b>	(DH NIn) vs (DH ZK)	2,68 (0,1145)	0,943 (0,3411)	0,514 (0,4802)	29,7 <b>(0,0000)</b>	0,149 (0,703)	0,003 (0,9564)	0,085 (0,7736)	0,11 (0,7427)	0,062 (0,8054)	0,698 (0,4116)
<b>E</b>	(DH NIn) vs (DH Ab-V5)	0,531 (0,4733)	1,14 (0,2973)	4,29 <b>(0,0493)</b>	13,4 <b>(0,0012)</b>	2,58 (0,1215)	0,142 (0,7097)	9,13 <b>(0,0059)</b>	1,4 (0,248)	0,296 (0,5913)	0,431 (0,5179)

**Apêndice 8.** Teste F (valor de P) para contrastes entre tratamentos de mudas de *Bauhinia forficata* (n = 10). Os contrastes foram ortogonais e previamente estabelecidos. CC: Capacidade de campo; DH: Déficit hídrico; NIn: mudas não inoculadas com bactérias associativas; ZK: mudas associadas a *Bacillus velezensis*; Ab-V5: mudas associadas a *Azospirillum brasilense*. MS raiz: massa seca da raiz (g), MS PA: massa seca da parte aérea (g), MS folhas (g), AF: área foliar total (cm<sup>2</sup>), FMF: fração da massa foliar (g g<sup>-1</sup>MS planta), RAF: razão da área foliar (cm<sup>2</sup> g<sup>-1</sup>MS planta), FMR: fração da massa da raiz (g g<sup>-1</sup>MS planta), R/PA: razão MS raiz/MS PA.

Contrastes		MS raiz	MS PA	MS folhas	AF	FMF	RAF	FMR	R/PA
<b>F(P)</b>									
<b>A</b>	(CC NIn) vs (DH NIn)	0,748 (0,3908)	0,239 (0,6266)	0,066 (0,798)	0,76 (0,3873)	0,005 (0,9434)	2,26 (0,1389)	2,15 (0,148)	2,96 (0,0912)
<b>B</b>	(CC NIn) vs (DH ZK)	0,407 (0,5261)	0,08 (0,7778)	0,051 (0,8214)	0,206 (0,6516)	0,782 (0,3803)	1,26 (0,2658)	1,28 (0,2634)	1,71 (0,1965)
<b>C</b>	(CC NIn) vs (DH Ab-V5)	1,44 (0,2361)	0,084 (0,7728)	0,7 (0,407)	0,654 (0,4223)	0,084 (0,7736)	0,069 (0,7942)	1,47 (0,2304)	2,35 (0,1313)
<b>D</b>	(DH NIn) vs (DH ZK)	0,052 (0,8213)	0,042 (0,8378)	0,234 (0,6304)	0,174 (0,678)	0,661 (0,4196)	0,143 (0,7072)	0,114 (0,737)	0,17 (0,6819)
<b>E</b>	(DH NIn) vs (DH Ab-V5)	0,111 (0,7404)	0,608 (0,4391)	0,337 (0,5647)	2,82 (0,0987)	0,047 (0,8284)	1,54 (0,2204)	0,065 (0,8)	0,035 (0,8517)

## 2 CAPÍTULO 2

### **Bactérias associativas e óxido nítrico aumentam a tolerância à seca de duas espécies arbóreas neotropicais**

Mariana Fernandes Hertel<sup>a,\*</sup>, Renata Stolf-Moreira<sup>a</sup>, José Antonio Pimenta<sup>a</sup>

<sup>a</sup>*Departamento de Biologia Animal e Vegetal, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brasil*

*\*Autor Correspondente: Departamento de Biologia Animal e Vegetal, Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid Km 380, Londrina, PR, 86057-970, Brasil*

*Email: mariana.f.h@hotmail.com*

Artigo a ser submetido para publicação na revista *Environmental and Experimental Botany*.

Fator de impacto: 3,712.

<https://www.journals.elsevier.com/environmental-and-experimental-botany>

#### *Destaques*

- As trocas gasosas de *Heliocarpus popayanensis* foram beneficiadas pelas bactérias associativas e as de *Cabralea canjerana* pelo óxido nítrico (NO)
- O conteúdo relativo de água das folhas de *H. popayanensis* foi maior em mudas associadas às BAs, e houve efeito sinérgico com NO
- A inoculação com as bactérias, e o tratamento simultâneo com bactérias e NO diminuiu os danos oxidativos nas folhas de *C. canjerana*

#### *Abreviações*

$A_{max}$ , assimilação líquida de CO<sub>2</sub>; BAs, bactérias associativas;  $g_s$ , condutância estomática; NIn, plantas não inoculadas com bactérias; NPs de NO, nanopartículas de quitosana/TPP contendo S-nitroso-MSA (doador de óxido nítrico).

## RESUMO

O déficit hídrico é um problema global que tem se agravado e resulta na limitação do crescimento e desenvolvimento das plantas. O reflorestamento de áreas degradadas é uma importante ação para recuperar ecossistemas nativos e mitigar danos do desflorestamento, entretanto o déficit hídrico é um estresse abiótico que diminui o sucesso do plantio de mudas. O objetivo deste estudo foi verificar se a inoculação com bactérias associativas (BAs) e a aplicação exógena de um doador de óxido nítrico, que são ferramentas envolvidas em respostas a estresses abióticos, podem promover maior tolerância à seca em plantas arbóreas da Mata Atlântica. Mudas de duas espécies foram submetidas ao déficit hídrico associadas com BAs e tratadas com nanopartículas contendo doador de óxido nítrico (NPs de NO), aplicadas ao solo. As respostas diferiram entre as espécies, *Heliocarpus popayanensis* Kunth (*H.p.*), intolerante à sombra e *Cabralea canjerana* (Vell.) Mart (*C.c.*), tolerante à sombra. As BAs aumentaram a assimilação de CO<sub>2</sub> ( $A_{max}$ ) de *H.p.*, e o conteúdo relativo de água das folhas, com um possível efeito sinérgico do tratamento com BAs e com NO. Para *C.c.* o NO aumentou a  $A_{max}$ . As BAs diminuíram a peroxidação lipídica das folhas das mudas de *C.c.*, sendo que também foi observado efeito sinérgico das BAs com o NO nesta resposta. Os resultados indicaram que tanto a associação com BAs quanto a aplicação de NPs de NO no solo resultaram em maior tolerância ao déficit hídrico nas duas espécies estudadas, sendo que o tratamento simultâneo apresentou vantagens para ambas as espécies.

**Palavras-chave:** *Azospirillum brasilense*, *Bacillus velezensis*, quitosana, *Heliocarpus popayanensis*, *Cabralea canjerana*, fotossíntese.

## ABSTRACT

Drought is a global issue that is becoming severe and can limit plants' growth and development. The Atlantic forest degradation has negative impacts on biodiversity, and reforestation of degraded areas is an important action to recover native ecosystems and diminish damages resulting from deforestation. However, drought is an abiotic stress that diminishes the success of plantings. The aim of this study was to verify if inoculation with associative bacteria (AB) and the application of an exogenous nitric oxide donor may promote higher tolerance to drought in Atlantic Forest tree species since these tools are important to promote abiotic stress tolerance. Seedlings of two species were subjected to drought in association with AB and treated with nanoparticles containing a nitric oxide donor (NO NPs) applied to the soil. The two species showed different responses, one is a pioneer, *Heliocarpus popayanensis* Kunth (*H.p.*) and the other is early secondary and shade tolerant, *Cabralea canjerana* (Vell.) Mart (*C.c.*). *H.p.* seedlings with the AB showed higher CO<sub>2</sub> assimilation rates and leaf relative water content, with a possible synergistic effect of AB and NO. *C.c.* seedlings showed higher photosynthesis rates with NO. The lipid peroxidation was diminished by AB in leaves of *C.c.*, with a synergistic effect of AB and NO. The results indicate that both the inoculation of AB and NO NPs application in the soil resulted in improved tolerance to drought in both tree species, and the simultaneous treatment showed better results for both species.

**Key words:** *Azospirillum brasilense*, *Bacillus velezensis*, chitosan, *Heliocarpus popayanensis*, *Cabralea canjerana*, photosynthesis.

## 2.1 INTRODUÇÃO

Eventos de seca têm aumentado nos últimos anos devido ao aquecimento global e alterações na ocorrência de chuvas, afetando a sobrevivência e composição de espécies em ambientes naturais (Malhi *et al.*, 2009; Oliveira *et al.*, 2018; Phillips *et al.*, 2009). Com o aumento da temperatura, as secas podem se tornar mais frequentes e severas (Trenberth *et al.*, 2014), somando-se a isto a crescente produção e demanda agrícola por produtos alimentícios, têxteis e combustíveis resulta num grande impacto nos recursos hídricos e na degradação do solo (Pfister *et al.*, 2011).

Um dos biomas mais afetados pela ação antrópica é a Mata Atlântica, da qual se estima que restam atualmente 11 a 16% de sua cobertura original (Ribeiro *et al.*, 2009) e que possui 60% das espécies de plantas e animais listadas como ameaçadas no Brasil (Rezende *et al.*, 2018). Assim, a necessidade de recuperar áreas degradadas é primordial, entretanto, as mudas devem ser capazes de tolerar as condições do ambiente desflorestado, como microclima mais quente e por consequência diminuição da disponibilidade de água (Ellison *et al.*, 2017).

A inoculação com bactérias promotoras do crescimento em plantas (BPCPs) ou bactérias associativas, pois nem sempre estimulam o crescimento das plantas, promove efeitos benéficos, já que podem solubilizar fosfatos, melhorar a resposta antioxidante, produzir sideróforos e hormônios como auxinas, citocininas, giberelinas e ABA, influenciando o metabolismo e crescimento das plantas (Bashan *et al.*, 2004; Bottini *et al.*, 1989; Chen *et al.*, 2006; Cohen *et al.*, 2008; Fukami *et al.*, 2018a; Goes *et al.*, 2012; Rodríguez e Fraga, 1999; Tien *et al.*, 1979). Portanto, mudas associadas a BPCPs tem maior chance de sobrevivência, crescimento e reprodução em ambientes submetidos a estresses bióticos e abióticos (Creus *et al.*, 2004; Tiepo *et al.*, 2018; Vardharajula *et al.*, 2011).

Os hormônios vegetais, produzidos por bactérias ou pela própria planta, atuam através de cascatas de sinalização que envolvem diferentes moléculas, dentre as quais se destaca o óxido nítrico (NO) (Freschi, 2013; Prakash *et al.*, 2019). O NO interage com todas as classes de hormônios vegetais, podendo atuar na origem do sinal hormonal ou como resposta ao sinal (revisado por Freschi, 2013). Este radical livre gasoso pode ter origem em diferentes processos celulares. Estudos indicam que uma das principais fontes enzimáticas de NO em plantas é a redutase

do nitrato (NR) (Rockel *et al.*, 2002; Meyer *et al.*, 2005; Kaiser *et al.*, 2010). Entre os principais mecanismos de ação do NO está a transformação pós-traducional de proteínas, denominada S-nitrosilação ou nitrosação (Astier e Lindermayr, 2012; Wang *et al.* 2015), que consiste na adição de NO a um resíduo de cisteína, formando uma ligação S-NO gerando S-nitrosoproteína (Freschi, 2013).

Além do NO endógeno, a aplicação exógena de NO pode desencadear respostas importantes de tolerância a estresses abióticos como intoxicação por metais pesados (Khairy *et al.*, 2016), salinidade (Oliveira *et al.*, 2016) e déficit hídrico (Silveira *et al.*, 2016). Devido a sua instabilidade e natureza gasosa a aplicação exógena é feita com moléculas doadoras deste radical livre, como S-nitroso-glutationa (GSNO), nitroprussiato de sódio (SNP), e ácido mercaptosuccínico (MSA; S-nitroso-MSA) (Silveira *et al.*, 2016; Kong *et al.*, 2016; Oliveira *et al.*, 2016).

Entretanto, mesmo as moléculas doadoras podem ser degradadas precocemente quando expostas à radiação solar e altas temperaturas (Seabra *et al.*, 2014). Desse modo, a nanoencapsulação das moléculas doadoras de NO é uma alternativa que resulta na liberação gradual e contínua do NO de modo a manter seu efeito no metabolismo das plantas e evitar uma possível toxicidade. Isto porque o NO pode reagir com outros radicais e espécies reativas de oxigênio formando outras espécies reativas de nitrogênio como peroxinitrito (Groß *et al.*, 2013; Hill *et al.*, 2010).

Oliveira *et al.* (2016) realizaram o primeiro estudo com plantas utilizando nanopartículas de quitosana/TPP contendo S-nitroso-MSA como doador de NO (NPs de NO). Esses autores encontraram melhora na tolerância de plantas de milho submetidas ao estresse salino tratadas com NPs de NO no solo comparadas a plantas não tratadas e tratadas com S-nitroso-MSA livre.

Considerando que as respostas das plantas a estresses abióticos, como déficit hídrico, são influenciadas por hormônios e que o NO atua como mensageiro destas respostas, o objetivo deste estudo foi verificar se mudas de espécies arbóreas nativas da Mata Atlântica submetidas ao déficit hídrico moderado (DH) associadas a bactérias associativas e com aplicação de nanopartículas de quitosana/TPP contendo S-nitroso-MSA no solo se tornam mais tolerantes ao DH. Para isso, foram verificadas respostas fisiológicas, bioquímicas e biométricas de mudas de *Heliocarpus popayanensis* Kunth (intolerante à sombra) e *Cabralea canjerana* (Vell.) Mart. (tolerante à sombra).

A hipótese levantada foi que a inoculação com uma das bactérias associativas, a aplicação de NPs de NO no solo de mudas não inoculadas e o efeito sinérgico entre bactéria e o NO vão aumentar a tolerância ao déficit hídrico das espécies arbóreas estudadas.

## 2.2. METODOLOGIA

### 2.2.1. Delineamento Experimental

Sementes de *Heliocarpus popayanensis* (Jangadeiro; intolerante à sombra; Silva e Soares-Silva, 2000) e *Cabralea canjerana* (Canjarana; tolerante à sombra que atinge o dossel; Silva e Soares-Silva, 2000) foram coletadas de no mínimo três indivíduos em regiões de fragmentos de Floresta Estacional Semidecidual e semeadas em areia em casa de vegetação. Após a semeadura, para os tratamentos com bactérias associativas, a areia foi regada com suspensão de células bacterianas a  $10^6$  UFC mL<sup>-1</sup> a 0,2 L de suspensão por 1 L de areia, sendo uma bandeja regada com *Bacillus velezensis* (ZK) e outra com *Azospirillum brasilense* (estirpe Ab-V5).

As bactérias utilizadas são parte da Coleção de Bactérias Promotoras do Crescimento em Plantas da Universidade Estadual de Londrina (UEL). *B. velezensis* (Ruíz-García *et al.*, 2005; Dunlap *et al.*, 2016) foi caracterizada como BPCP por Goes *et al.* (2012), e *Azospirillum brasilense* (diazotrófica, estirpe Ab-V5) é registrada no Ministério da Agricultura para uso em inoculantes comerciais (Hungria *et al.*, 2010). Os inóculos foram preparados de acordo com Oliveira *et al.* (2017). No presente estudo as bactérias serão denominadas como bactérias associativas.

Após expandir um par de folhas, as plântulas foram transferidas para sacos (2 L, 15 cm de altura e 13 cm de diâmetro) contendo substrato com areia e solo argiloso (1:1). Foi feito o transplântio de uma muda por saco. As mudas de *H. popayanensis* foram transplantadas quatro meses após a semeadura e as mudas de *C. canjerana* dois meses após a semeadura. As plântulas selecionadas para o transplântio apresentavam uniformidade de tamanho e aparência tanto dentro de um tratamento, quanto entre tratamentos (não inoculadas, com ZK e com Ab-V5). No transplântio, cada saco foi regado com 30 mL de suspensão de inóculos a  $10^6$  cél. mL<sup>-1</sup>. As mudas permaneceram em período de aclimatação e crescimento até o desenvolvimento de pelo menos mais três pares de folhas totalmente expandidas,

durante quatro meses para as mudas de *H. popayanensis* e três meses para as mudas de *C. canjerana*. Durante este período, os sacos das plântulas foram regados com 15 mL de solução nutritiva de Hoagland uma vez por mês.

O déficit hídrico moderado (DH, 16% umidade gravimétrica (UG), previamente determinada) foi aplicado após o período de aclimação e crescimento. Metade das mudas (72 plantas) foi submetida ao déficit hídrico, com suspensão da rega até atingir a primeira murcha, e a outra foi mantida em solo na capacidade de campo (CC, 27% UG previamente determinada) durante três semanas. A manutenção do DH foi feita com regas limitadas de acordo com o grau de murcha das folhas, e da textura e aparência do solo, de modo a manter as plantas com restrição hídrica evitando risco de morte. Como critério para evitar este risco controlou-se a flacidez das folhas e a turgescência do pecíolo. O monitoramento e a rega das mudas eram feitos no máximo a cada dois dias, sendo que em semanas quentes, com temperatura próxima de 30°C, o monitoramento era diário.

Após atingir o DH, iniciou-se o tratamento com NPs de quitosana/TPP contendo S-nitroso MSA como doador de NO. No dia da aplicação, a suspensão de nanopartículas contendo MSA era nitrosilada com NaNO<sub>2</sub> (20 mM) e em seguida mantida em geladeira (a 10°C) no escuro por 1h. Após este período, a solução a 20 mM era diluída com água deionizada a 0,4 mM para aplicação. Um volume de 8 mL da suspensão era aplicado a cada vaso do tratamento com NPs de NO por 3 dias consecutivos, ao longo de 3 semanas. O mesmo volume de água era adicionado aos vasos das mudas que não eram tratadas com NPs de NO. Caso o solo das mudas em DH estivesse muito seco, e as mudas estivessem com murcha excessiva, estes vasos eram regados no máximo uma hora antes da aplicação da suspensão contendo NO, para evitar diluição no momento da rega com as NPs de NO.

O experimento com as mudas de *C. canjerana* foi conduzido de março a abril de 2018 e com as mudas de *H. popayanensis* de maio a junho de 2018. Segundo dados do IAPAR (2018) para o mês de março de 2018 a temperatura mínima foi de 20,8°C e a máxima 28°C, em abril a mínima foi 17,5°C e a máxima 28,5°C. Em maio a temperatura mínima foi de 16,6°C e a máxima 28°C, em junho a mínima foi 14,8°C e a máxima 21,3°C. Para manutenção da temperatura da casa de vegetação próxima dos 25°C durante os meses de outono e início de inverno, as paredes laterais plásticas eram fechadas durante os momentos mais frios do dia, do fim da tarde até às 12h do dia seguinte. A radiação fotossinteticamente ativa ao meio-dia

era de aproximadamente  $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  dentro da casa de vegetação.

### 2.2.2. Trocas Gasosas

Foram avaliadas a assimilação líquida de  $\text{CO}_2$  ( $A_{\text{max}}$ ,  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), a condutância estomática ( $g_s$ ,  $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), a transpiração ( $E$ ,  $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), e a concentração intercelular de  $\text{CO}_2$  ( $C_i$ ,  $\mu\text{mol mol}^{-1}$ ). As medidas foram realizadas utilizando um analisador de gás por infravermelho (IRGA) portátil modelo LICOR 6400 XT (*LI-COR Biosciences*, Lincoln, EUA) conectado a uma câmara de  $6 \text{ cm}^2$  sob uma radiação fotossinteticamente ativa saturante de  $1900 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e fluxo de  $380 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Foram calculadas a eficiência intrínseca no uso da água ( $\text{EUA}_i$ :  $A_{\text{max}}/g_s$ ,  $\mu\text{mol mol}^{-1}$ ), a razão entre a  $C_i$  e a concentração  $\text{CO}_2$  no ambiente ( $C_i/C_a$ ) e a eficiência instantânea de carboxilação ( $k$ ;  $A_{\text{max}}/C_i$ ,  $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ).

As medidas foram feitas entre 8 e 11 horas, em dias ensolarados. A 3ª ou 4ª folha do ápice para a base completamente expandida de cada muda foi utilizada.

### 2.2.3. Conteúdo Relativo De Água

Folhas ou folíolos totalmente expandidos foram coletados e imediatamente foi aferida a massa fresca. Em seguida, foram submersos por 4h em água deionizada dentro de câmaras de hidratação protegidas da luz e em temperatura ambiente para aferir a massa túrgida. Após permanecer em estufa a  $60^\circ\text{C}$  até atingir massa constante foi aferida a massa seca.

O cálculo do conteúdo relativo de água (%) foi feito da seguinte maneira:

$$\text{CRA} = \left( \frac{\text{massa fresca} - \text{massa seca}}{\text{massa túrgida} - \text{massa seca}} \right) \times 100$$

### 2.2.4. Análises Bioquímicas

Para determinar a peroxidação lipídica, o conteúdo de dienos conjugados foi dosado utilizando 50 mg de massa fresca de folha macerada em  $\text{N}_2$  líquido e homogeneizada com etanol 96% (v/v) a  $4^\circ\text{C}$ . A absorbância do sobrenadante foi detectada a 234 nm e a 500 nm para eliminação de interferência utilizando o espectrofotômetro *Genesys 10S UV-Vis* (*Thermo Fisher Scientific Inc.*, Waltham,

EUA). O conteúdo de dienos conjugados foi calculado utilizando o coeficiente de extinção molar  $\epsilon = 2.65 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Boveris *et al.*, 1980).

Para extração e determinação da concentração de peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), 100 mg de massa fresca de folha foram macerados com  $\text{N}_2$  líquido e ácido tricloroacético a 0,2% em metanol seguido de centrifugação a 10000 x g por 5 minutos a 4°C. Após reação em gelo com tampão fosfato de potássio 0,1 M (pH 7,5) e KI 1 M a determinação foi feita por espectrofotometria a 390 nm, utilizando o leitor de microplacas *Victor TM 3* (*Perkin Elmer*, Turku, Finlândia).

Para determinação do conteúdo de S-nitrosotióis, 40 mg de massa fresca de folha foram maceradas em  $\text{N}_2$  líquido e adicionadas de 2 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada. O extrato foi centrifugado e alíquotas de 200  $\mu\text{L}$  do sobrenadante foram adicionados à 15 mL de solução de KI +  $\text{H}_2\text{SO}_4$  para redução de S-nitrosotióis a NO. A detecção foi feita com um sensor específico para NO (ISO-NOP 2 mm) conectado ao amperômetro WPI TBR4100/1025 (*World Precision Instruments*, Sarasota, EUA). As amostragens foram realizadas em duplicata, e as curvas de calibração foram obtidas com soluções aquosas de S-nitrosoglutationa (GSNO) nas concentrações 25, 50, 75, 100, 150, 200  $\mu\text{M}$ .

#### 2.2.5. Parâmetros Biométricos

A área foliar total ( $\text{cm}^2$ ) das folhas completamente expandidas foi medida utilizando o medidor de área foliar modelo LI-3000CAP acoplado à esteira LI-3050C (*LI-COR Biosciences*, Lincoln, EUA). Folhas com aspecto amarelado, indicativo de senescência, não foram incluídas. As folhas, o caule e a raiz foram colocados em estufa a 60°C até atingirem massa constante para aferir a massa seca (g). Foram calculadas a fração da massa foliar (FMF: massa seca da folha/massa seca da planta), a razão da área foliar (RAF: área foliar/massa seca da planta;  $\text{cm}^2 \text{ g}^{-1}$ ), e a razão da massa da raiz pela massa da parte aérea (R/PA).

#### 2.2.6. Análise Estatística

O experimento teve delineamento inteiramente ao acaso e ocorreu em casa de vegetação. Os tratamentos eram NIn S/NO CC (controle, mudas não inoculadas sem NPs de NO em solo na CC), NIn S/NO DH (mudas não inoculadas sem NPs de

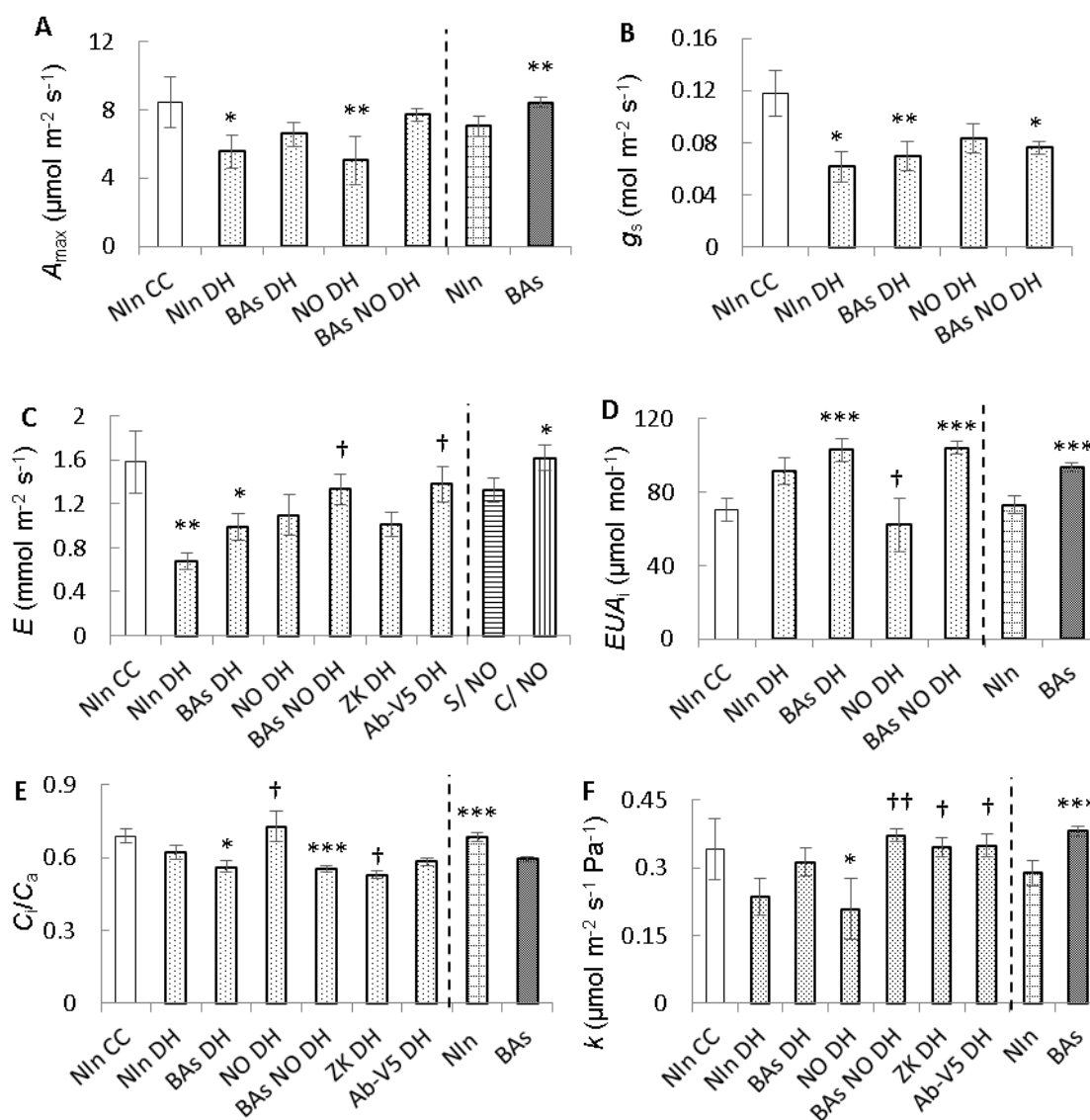
NO em DH), NIn C/NO DH (mudas não inoculadas com NPs de NO em DH); ZK S/NO DH (mudas inoculadas com *Bacillus velezensis* sem NPs de NO em DH), Ab-V5 S/NO DH (mudas inoculadas com *Azospirillum brasilense* sem NPs de NO em DH), ZK C/NO DH (mudas inoculadas com *Bacillus velezensis* com NPs de NO em DH) e Ab-V5 C/NO DH (mudas inoculadas com *Azospirillum brasilense* com NPs de NO em DH). Os dados foram submetidos à comparação por contrastes ortogonais previamente estabelecidos. A comparação entre os grupos de médias foi feita pelo teste F, com nível de significância de 5%, utilizando o programa *Statistica* versão 12.0 (StatSoft, Tulsa, EUA). As tabelas referentes aos contrastes e respectivos valores calculados de F e de p estão como apêndices.

## 2.3. RESULTADOS

### 2.3.1. *Heliocarpus Popayanensis*

O déficit hídrico diminuiu a assimilação de CO<sub>2</sub> apenas das mudas de *H. popayanensis* NIn e das mudas com NO (Figura 1A; Apêndice 1, contrastes A e C), já a inoculação com as BAs, tanto sem NO quanto com NO, impediu a queda da  $A_{max}$  em relação às mudas NIn CC (Figura 1A; Apêndice 1, contrastes B e D). Ainda, ao considerar todas as mudas inoculadas com as BAs, tanto mantidas em solo na CC, quanto aquelas em DH, e tanto as sem NO, quanto as mudas com NO, a  $A_{max}$  foi maior que das mudas NIn (Figura 1A; Apêndice 1, contraste K).

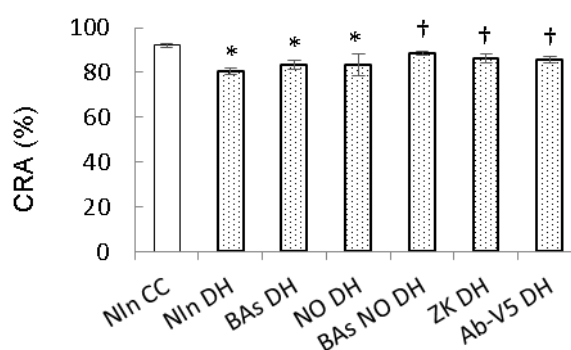
As mudas de todos os tratamentos em DH de *H. popayanensis* tiveram queda da condutância estomática em relação às mudas NIn CC, exceto as mudas com NO em DH, que mantiveram a  $g_s$  igual destas últimas (Figura 1B; Apêndice 1, contrastes A ao D). Entretanto, apenas as mudas NIn DH e as mudas inoculadas com BAs em DH tiveram menor transpiração que mudas NIn CC (Figura 1C; Apêndice 1, contrastes A ao D). E, comparando-se as mudas em DH, aquelas inoculadas com BAs e com NO e as mudas inoculadas com Ab-V5 (tanto sem quanto com NO) tiveram maior  $E$  que mudas NIn (Figura 1C; Apêndice 1, contrastes E ao I). De modo geral, todas as mudas com NO tiveram maior  $E$  que mudas sem NO (Figura 1C; Apêndice 1, contraste J).



**Figura 1.** Trocas gasosas de folhas de mudas de *Heliconia popayanensis* ( $n = 6$ ).  $A_{max}$ : assimilação líquida de  $\text{CO}_2$ ;  $g_s$ : condutância estomática;  $E$ : transpiração;  $EUA_i$ : eficiência intrínseca no uso da água;  $C_i/C_a$ : Razão da concentração intercelular de  $\text{CO}_2$  pela concentração ambiente;  $k$ : eficiência instantânea de carboxilação. Nln: Mudas não inoculadas com bactérias associativas (BAs); BAS: Mudas inoculadas com BA; NO: Mudas em solo com aplicação de nanopartículas contendo doador de óxido nítrico (NO); ZK: Mudas inoculadas com *Bacillus velezensis*; Ab-V5: Mudas inoculadas com *Azospirillum brasilense*; CC: Mudas em solo na capacidade de campo; DH: Mudas em solo em déficit hídrico. Barra quadriculada: Mudas não inoculadas com BA tanto em solo na CC quanto em DH e tanto sem NO quanto com NO; barra hachurada: Mudas inoculadas com BA tanto em solo na CC quanto em DH e tanto sem NO quanto com NO. \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$  (Contrastes ortogonais: Nln CC x cada tratamento em DH; após linha tracejada S/ NO x C/ NO, e Nln x BPCPs). † =  $p < 0,05$ ; †† =  $p < 0,01$  (Contrastes ortogonais: Nln DH x cada tratamento em DH).

A inoculação com BAs nas mudas em DH aumentou a  $EUA_i$  em relação às mudas NIn CC (Figura 1D; Apêndice 1, contrastes B e D). Já as mudas com NO em DH tiveram menor  $EUA_i$  que mudas NIn CC (Figura 1D; Apêndice 1, contraste F). A inoculação com as BAs aumentou a  $EUA_i$  de todas as mudas inoculadas, tanto na CC quanto em DH e tanto sem quanto com NO, quando comparadas às mudas NIn (Figura 1D; Apêndice 1, contraste K).

Mudas inoculadas com as BAs em DH, tanto as mudas sem NO quanto aquelas com NO, tiveram menor razão da concentração intercelular de  $CO_2$  pela concentração ambiente ( $C_i/C_a$ ) que mudas NIn CC (Figura 1E; Apêndice 1, contraste A). Comparando-se as mudas em DH, aquelas com NO tiveram maior  $C_i/C_a$  que mudas NIn DH, e as mudas inoculadas com ZK (tanto sem quanto com NO) tiveram menor  $C_i/C_a$  que mudas NIn DH (Figura 1E; Apêndice 1, contrastes F e H). De modo geral, considerando tanto as mudas em solo na CC quanto em DH e tanto aquelas sem NO quanto com, a inoculação com BPCPs reduziu a  $C_i/C_a$  em relação às mudas NIn (Figura 1E; Apêndice 1, contraste K).



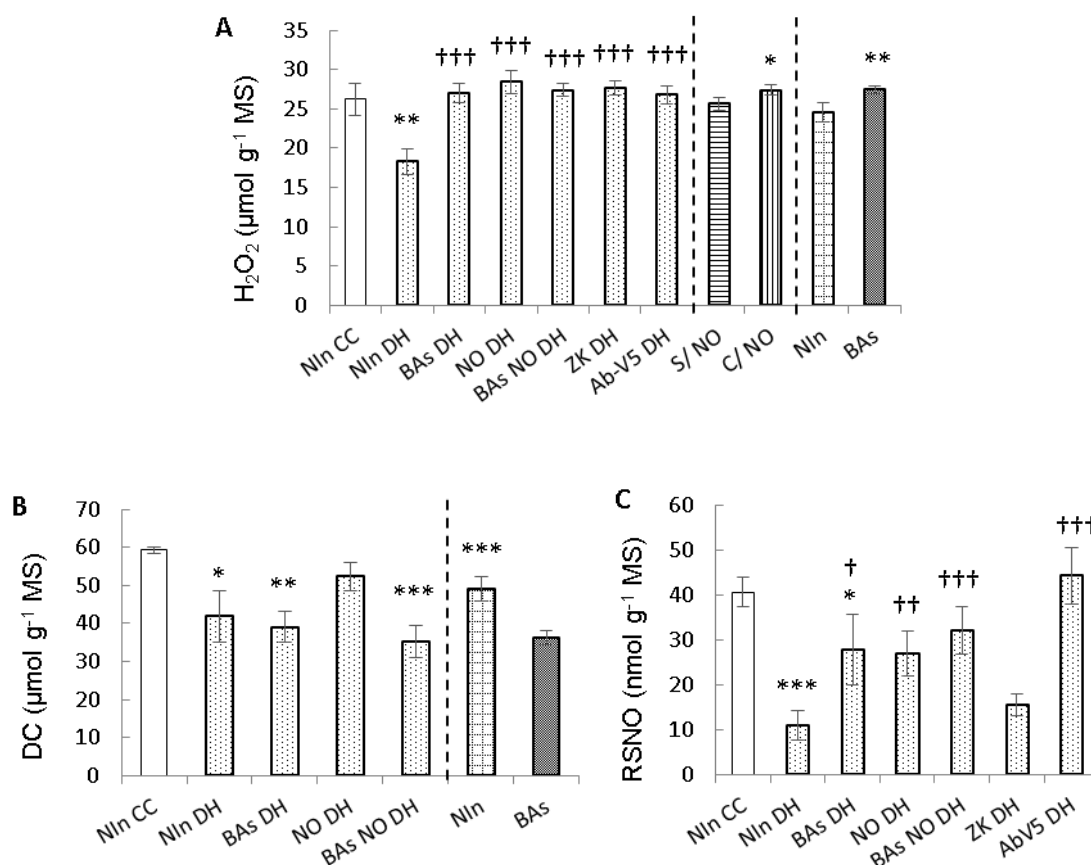
**Figura 2.** Conteúdo relativo de água de folhas de *Heliocarpus popayanensis* ( $n = 5$ ). NIn: Mudanças não inoculadas com bactérias associativas (BA); BAs: Mudanças inoculadas com BA; NO: Mudanças em solo com aplicação de nanopartículas contendo doador de óxido nítrico (NO); ZK: Mudanças inoculadas com *Bacillus velezensis*; Ab-V5: Mudanças inoculadas com *Azospirillum brasilense*; CC: Mudanças em solo na capacidade de campo; DH: Mudanças em solo em déficit hídrico. \* =  $p < 0,05$  (Contrastes ortogonais: NIn CC x cada tratamento em DH). † =  $p < 0,05$ ; †† =  $p < 0,01$  (Contrastes ortogonais: NIn DH x cada tratamento em DH).

A eficiência instantânea de carboxilação ( $k$ ) das mudas inoculadas com as BAs e tratadas com NO em DH foi maior que das mudas NIn em DH, e o mesmo foi observado para as mudas inoculadas com ZK e para as mudas inoculadas com Ab-V5, tanto sem quanto com NO (Figura 1F). Já as mudas NIn com NO em DH tiveram redução da  $k$  em relação às mudas NIn CC (Figura 1F). Considerando todas as mudas inoculadas com as BAs, tanto aquelas mantidas em solo na CC quanto em DH, e tanto aquelas com NO quanto sem NO, a  $k$  foi maior do que das mudas NIn (Figura 1F).

O déficit hídrico diminuiu o CRA das folhas das mudas de *H. popayanensis* em todos os tratamentos, exceto nas mudas associadas às BAs e com NO (Figura 2; Apêndice 1, contraste A-D). Comparando-se as mudas em DH, aquelas inoculadas com ZK e com Ab-V5, e as mudas com BAs e com NO apresentaram maior CRA do que mudas NIn DH (Figura 2; Apêndice 1, contrastes H, I e G).

Apenas as mudas NIn DH tiveram menor concentração foliar de  $H_2O_2$  que as mudas NIn CC (Figura 3A; Apêndice 2, contraste A). Já considerando as mudas em solo com DH, as plantas de todos os tratamentos apresentaram mais  $H_2O_2$  que mudas NIn DH (Figura 3B; Apêndice 2, contraste E-I). De modo geral, a inoculação com BAs aumentou a concentração foliar de  $H_2O_2$  em relação às mudas NIn, e mudas com NO tiveram mais  $H_2O_2$  que mudas sem NO (Figura 3A; Apêndice 2, contrastes J e K).

As mudas de *H. popayanensis* de todos os tratamentos em DH tiveram menor peroxidação lipídica que as mudas NIn CC, como verificado pela concentração de dienos conjugados nas folhas, sendo que apenas as mudas com NO em DH não diferiram das mudas NIn CC (Figura 3B; Apêndice 2, contraste A-D). A inoculação com as BAs diminuiu a peroxidação lipídica das folhas das mudas, independente da condição hídrica e da presença ou não de NO em relação às mudas NIn (Figura 3B; Apêndice 2, contraste K).



**Figura 3.** Peróxido de Hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; A); Dienos Conjugados (DC; B) e S-nitrosotióis (RSNO; C) de folhas de mudas de *Helicarpus popayanensis* (n = 5; NIn DH n = 4). NIn: Mudas não inoculadas com bactérias associativas (BA); BAs: Mudas inoculadas com BAs; NO: Mudas em solo com aplicação de nanopartículas contendo doador de óxido nítrico (NO); ZK: Mudas inoculadas com *Bacillus velezensis*; Ab-V5: Mudas inoculadas com *Azospirillum brasilense*; CC: Mudas em solo na capacidade de campo; DH: Mudas em solo em déficit hídrico. Barra quadriculada: Mudas não inoculadas com BA tanto em solo na CC quanto em DH e tanto sem NO quanto com NO; barra hachurada: Mudas inoculadas com BA tanto em solo na CC quanto em DH e tanto sem NO quanto com NO. \* = p<0,05; \*\* = <0,01; \*\*\* = p<0,001 (Contrastes ortogonais: NIn CC x cada tratamento em DH; após linha tracejada S/ NO x C/ NO, e NIn x BPCPs). † = p<0,05; †† = p<0,01; ††† = p<0,001 (Contrastes ortogonais NIn DH x cada tratamento em DH).

Mudas NIn em DH e inoculadas com BAs em DH tiveram menos S-nitrosotióis que mudas NIn CC (Figura 3C; Apêndice 2, contraste A-D). Considerando mudas em DH, a inoculação com as BAs, a presença de NO e especificamente a inoculação com Ab-V5 aumentaram a concentração de S-nitrosotióis das folhas quando comparadas às mudas NIn DH (Figura 3C; Apêndice 2, contrastes E, F, G e I).

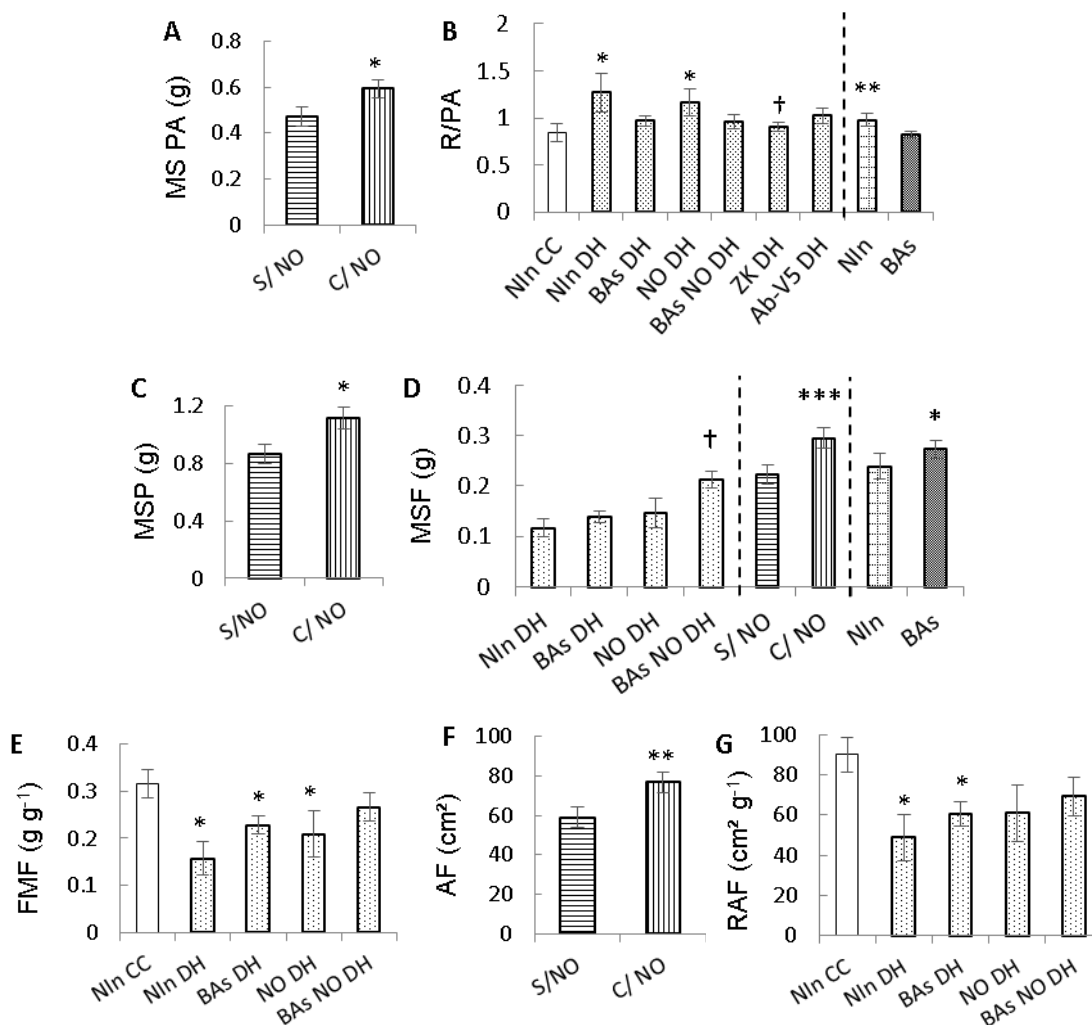
A massa seca da raiz das mudas de *H. popayanensis* não foi afetada por nenhum tratamento (dados não apresentados). A massa seca da parte aérea

também não foi afetada pelo DH, mas mudas com NO em ambas as condições hídricas, tanto com quanto sem BAs, tiveram maior massa seca da PA que mudas sem NO, o mesmo foi observado para a massa seca da planta (Figura 4A, C; Apêndice 3, contraste J).

Mudas NIn DH e mudas com NO em DH tiveram maior razão raiz/parte aérea que mudas NIn CC (Figura 4B; Apêndice 3, contrastes A e C). Considerando as mudas em DH, a inoculação com ZK diminuiu a razão R/PA em relação às mudas NIn DH (Figura 4B; Apêndice 3, contraste H). Considerando todas as mudas inoculadas com BAs a razão R/PA foi menor que das mudas NIn (Figura 4B; Apêndice 3, contraste K).

A massa seca das folhas das mudas em DH foi maior naquelas inoculadas com BAs e tratadas com NO do que das mudas NIn DH (Figura 4D; Apêndice 3, contraste G). Considerando mudas em ambas as condições hídricas, as mudas com NO (com e sem BPCPs) e mudas inoculadas com BPCPs (com e sem NPs de NO) tiveram maior massa seca foliar do que mudas sem NO e NIn, respectivamente (Figura 4D; Apêndice 3, contrastes J e K).

A fração da massa foliar foi menor em todos os tratamentos em DH quando comparados às mudas NIn CC, exceto para aquelas inoculadas com BPCPs e tratadas com NO em DH (Figura 4E; Apêndice 3, contraste A-C). A área foliar total foi maior nas mudas com NO em comparação àquelas sem NO, considerando tanto as mudas em solo na CC quanto em DH e também mudas com e sem BPCPs (Figura 4F; Apêndice 3, contraste A-D). Para as mudas NIn DH e aquelas inoculadas com as BPCPs em DH a RAF foi menor em comparação às mudas NIn CC (Figura 4G; Apêndice 3, contraste A). Já as mudas em DH com NO e tratadas simultaneamente com BPCPs e NO em DH tiveram a mesma RAF que mudas NIn CC (Figura 4G; Apêndice 3, contrastes C e D).



**Figura 4.** Parâmetros biométricos de mudas de *Heliocarpus popayanensis* ( $n = 7$ ; NIn DH  $n = 3$ ). A: Massa seca (MS) da parte aérea; B: Razão da massa da raiz pela massa da parte aérea; C: MS da planta; D: MS das folhas; E: Fração da massa foliar; F: Área foliar total; G: Razão da área foliar. S/ NO: Mudanças em solo sem aplicação de nanopartículas contendo doador de óxido nítrico (NPs de NO); C/ NO: Mudanças em solo com aplicação de NPs de NO; NIn: mudas não inoculadas com bactérias associativas (BA); BAs: mudas inoculadas com BAs; ZK: mudas inoculadas com *Bacillus velentzisi*, tanto sem NO quanto com; Ab-V5: mudas inoculadas com *Azospirillum brasilense*, tanto sem NO quanto com; CC: mudas em solo na capacidade de campo; DH: mudas sob déficit hídrico. Barras quadriculadas: mudas NIn tanto em solo na CC quanto em DH, e tanto sem quanto com NO; barra hachurada: mudas inoculadas com BAs tanto em solo na CC quanto em DH, e tanto sem quanto com NO. \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$  (Contrastes ortogonais: NIn CC x cada tratamento em DH; após linha tracejada: S/ NO x C/ NO, e NIn x BPCPs). † =  $p < 0,05$  (Contrastes ortogonais NIn DH x cada tratamento em DH).

A AFE das mudas de *H. popayanensis* inoculadas com BPCPs e com NO em DH foi menor que das mudas NIn CC (Figura 4G; Apêndice 3, contraste D). Comparando-se as mudas em DH, aquelas inoculadas com BPCPs, tratadas tanto com BPCPs quanto com NO, e inoculadas com ZK e com Ab-V5 tiveram menor AFE

que as mudas NIn DH (Figura 4G; Apêndice 3, contrastes E, G-I). A inoculação com as BPCPs em mudas tanto na CC quanto em DH, e tanto sem quanto com NO diminuiu a AFE das mudas quando comparadas às mudas NIn (Tabela 3; Apêndice 3, contraste K).

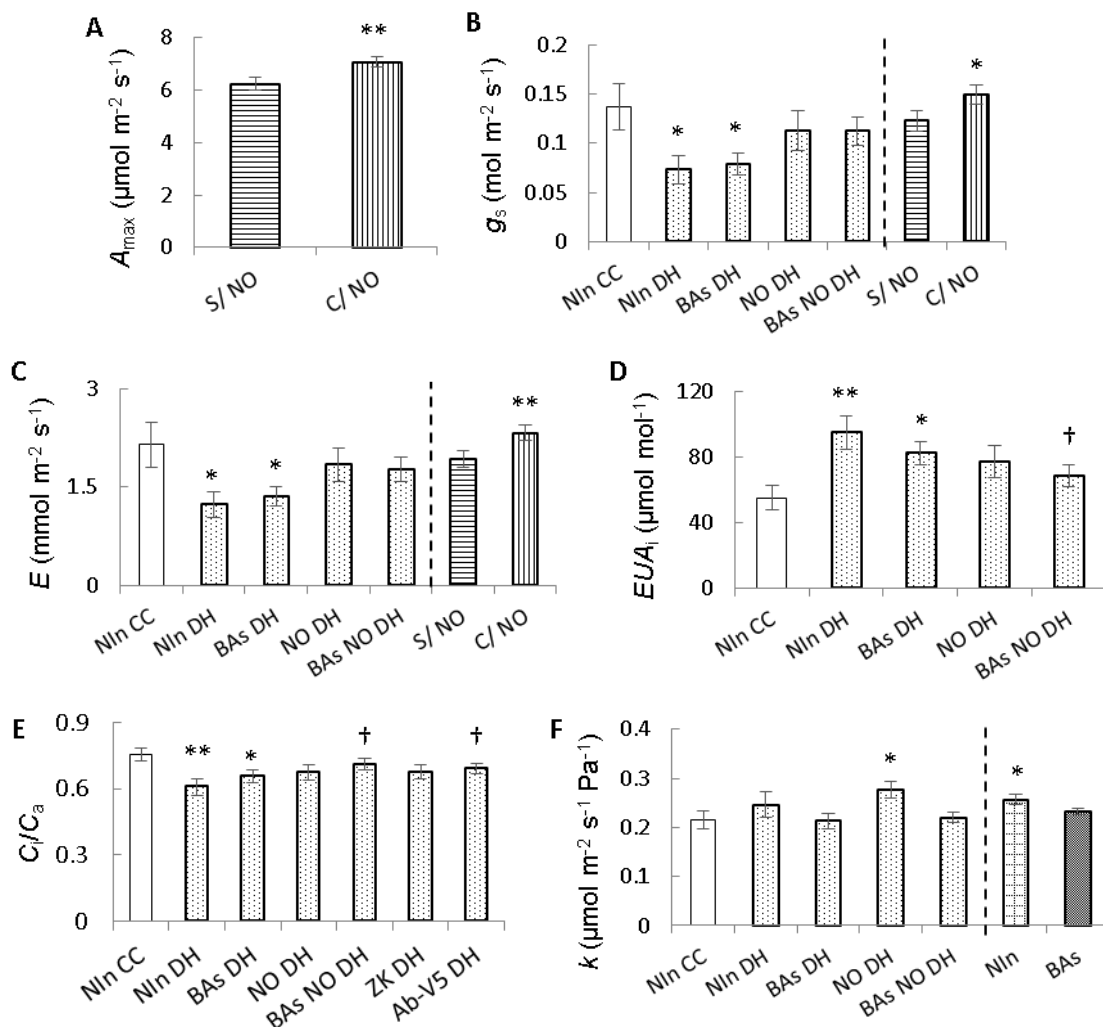
### 2.3.2. *Cabralea Canjerana*

Nenhum dos tratamentos com déficit hídrico afetou a  $A_{max}$  das mudas de *C. canjerana* (Tabela 4; Apêndice 4, contraste A-D). Entretanto, independente da condição hídrica e da presença ou não de BAs, mudas de *C. canjerana* com NO tiveram maior assimilação líquida de  $CO_2$  do que mudas sem NO (Figura 5A; Tabela 4; Apêndice 4, contraste J). A condutância estomática ( $g_s$ ) e a transpiração ( $E$ ) de mudas NIn em DH e das inoculadas com BAs em DH foram menores que daquelas NIn CC (Figura 5B e C; Tabela 4; Apêndice 4, contrastes A e B). Mudanças com NO, independente da condição hídrica e da presença ou não de BAs, tiveram maior  $g_s$  e consequentemente maior  $E$  que mudas sem NO (Figura 5B e C; Tabela 4; Apêndice 4, contraste J).

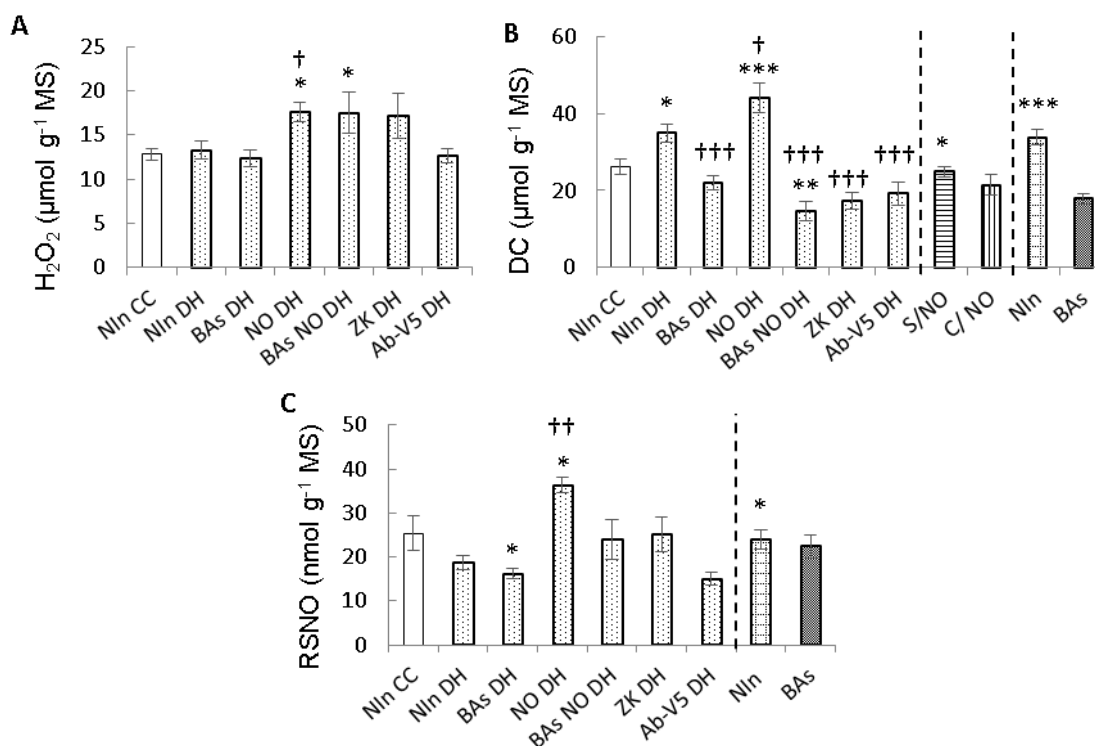
A  $EUA_i$  das mudas em DH NIn e inoculadas com BAs foi maior do que a das mudas NIn CC (Figura 5D; Tabela 4; Apêndice 4, contrastes A e B). Entre as mudas em DH, aquelas inoculadas com BAs e com NO tiveram menor  $EUA_i$  do que mudas NIn (Figura 5D; Tabela 4; Apêndice 4, contraste G).

A  $C_i/C_a$  das mudas NIn DH e das inoculadas com BAs em DH foi menor que das mudas NIn CC (Figura 5E; Tabela 4; Apêndice 4, contrastes A e B). Comparadas às mudas NIn DH, aquelas inoculadas com as BAs e com NO em DH e as mudas inoculadas com Ab-V5 em DH tiveram maior  $C_i/C_a$  (Figura 5E; Tabela 4; Apêndice 4, contrastes G e I). Mudanças em DH com NO tiveram maior  $k$  do que mudas NIn CC (Figura 5F; Tabela 4; Apêndice 4, contraste C). Considerando mudas na CC e em DH, com e sem NPs de NO, a inoculação com as BAs diminuiu a  $k$  (Figura 5F; Tabela 4; Apêndice 4, contraste K).

O CRA dos folíolos das mudas de *C. canjerana* não foi afetado pelo déficit hídrico e por nenhum tratamento (Tabela 4; Apêndice 4).



**Figura 5.** Trocas gasosas de folhas de mudas de *Cabralea canjerana* ( $n = 10$ ). A: Assimilação líquida de  $\text{CO}_2$ ; B: condutância estomática; C: transpiração; D: eficiência intrínseca no uso da água; E: razão da concentração intercelular de  $\text{CO}_2$  pela concentração ambiente; F: eficiência instantânea de carboxilação. Nln: mudas não inoculadas com bactérias associativas (BAs); BAs: mudas inoculadas com BAs; CC: mudas em solo na capacidade de campo; DH: mudas em solo sob déficit hídrico; S/ NO: mudas em solo sem aplicação de nanopartículas contendo doador de óxido nítrico (NO); C/ NO: mudas em solo com aplicação de NO. Barra com listras horizontais: mudas em solo sem NO, tanto na CC quanto em DH, e tanto sem BAs quanto com BAs; Barra com listras verticais: mudas em solo com NO, tanto na CC quanto em DH, e tanto sem BAs quanto com BAs. Barra quadriculada: Mudanças não inoculadas com BA tanto em solo na CC quanto em DH e tanto sem NO quanto com NO; barra hachurada: Mudanças inoculadas com BA tanto em solo na CC quanto em DH e tanto sem NO quanto com NO. \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $< 0,01$  (Contrastes ortogonais: Nln CC x cada tratamento em DH; após linha tracejada: S/ NO x C/ NO, e Nln x BAs). † =  $p < 0,05$  (Contrastes ortogonais Nln DH x cada tratamento em DH).



**Figura 6.** Peróxido de Hidrogênio (A); Dienos Conjugados (B) e S-nitrosotióis (C) de folhas de mudas de *Cabralea canjerana* (n = 5). NIn: Mudas não inoculadas com bactérias associativas (BAs); BAs: Mudas inoculadas com BAs; ZK: Mudas inoculadas com *Bacillus velezensis*; Ab-V5: Mudas inoculadas com *Azospirillum brasilense*; CC: Mudas em solo na capacidade de campo; DH: Mudas em solo em déficit hídrico. S/ NO: mudas em solo sem aplicação de nanopartículas contendo doador de óxido nítrico (NO); C/ NO: mudas em solo com aplicação de NO. Barra com listras horizontais: mudas em solo sem NO, tanto na CC quanto em DH, e tanto sem BAs quanto com BAs; Barra com listras verticais: mudas em solo com NO, tanto na CC quanto em DH, e tanto sem BAs quanto com BAs. Barra quadriculada: Mudas não inoculadas com BA tanto em solo na CC quanto em DH e tanto sem NO quanto com NO; barra hachurada: Mudas inoculadas com BA tanto em solo na CC quanto em DH e tanto sem NO quanto com NO. \* = p<0,05; \*\* = <0,01; \*\*\* = p<0,001 (Contrastes ortogonais: NIn CC x cada tratamento em DH; após linha tracejada: S/ NO x C/ NO, e NIn x BAs). † = p<0,05; †† = p<0,01; ††† = p<0,001 (Contrastes ortogonais NIn DH x cada tratamento em DH).

A concentração de  $H_2O_2$  nas folhas das mudas de *C. canjerana* com NO e daquelas inoculadas com BAs e com NO foi maior que das mudas NIn CC (Figura 6A; Apêndice 5, contrastes C e D). Em DH, as mudas com NO tiveram mais  $H_2O_2$  que mudas NIn DH (Figura 6A; Apêndice 5, contraste F). A concentração de dienos conjugados das folhas foi maior naquelas NIn em DH e nas com NO em DH comparadas às NIn CC (Figura 6B; Apêndice 5, contrastes A e C). Já a inoculação com BAs e o tratamento simultâneo com NO diminuiu a peroxidação lipídica (dienos conjugados) das folhas destas mudas em DH (Figura 6B; Apêndice 5, contraste D). Comparando-se mudas em DH, as mudas de todos os tratamentos com BAs tiveram

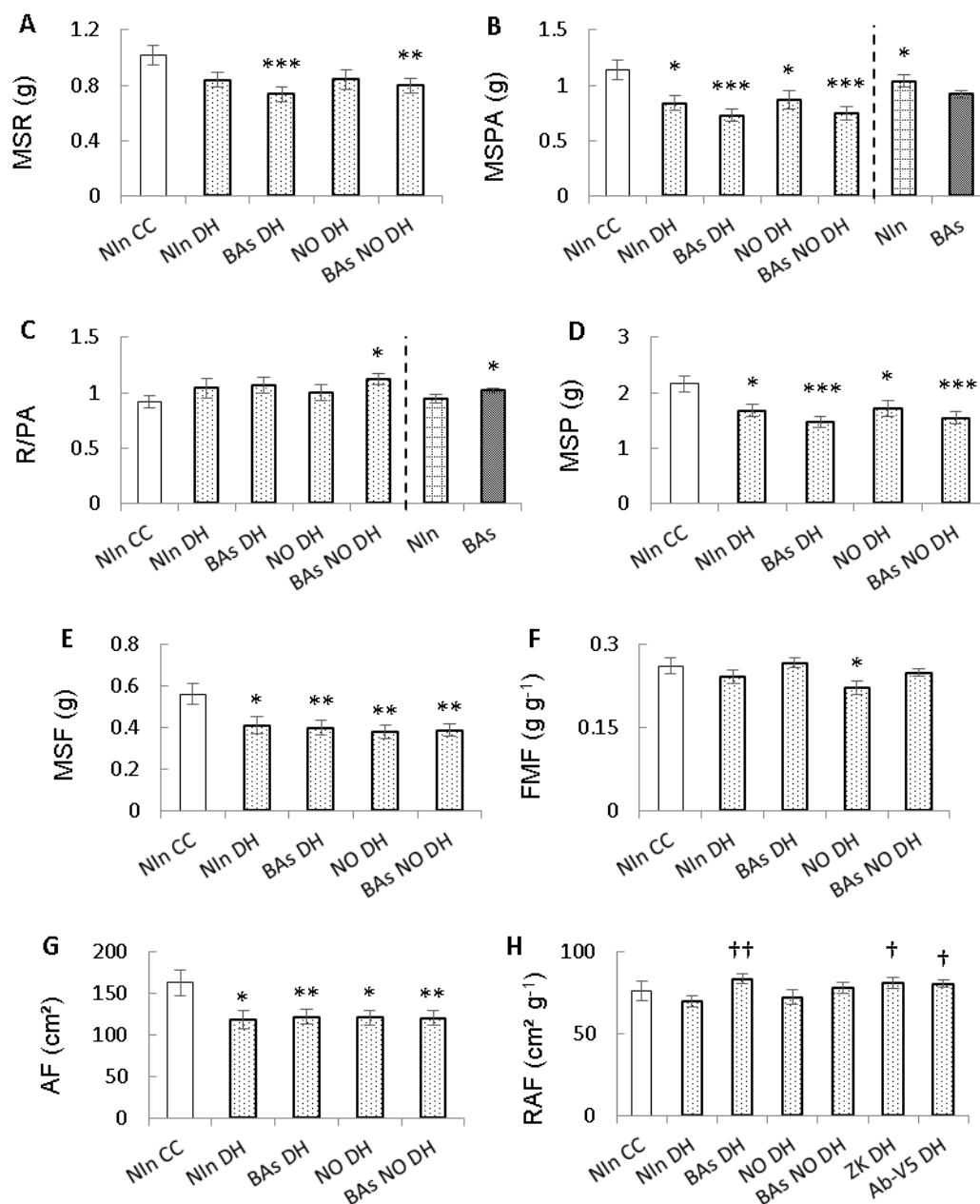
menor peroxidação lipídica do que as NIn DH (Figura 6B; Apêndice 5, contrastes E-I). Considerando todas as mudas com NO, estas tiveram menos dienos do que mudas sem NO, possivelmente por causa das mudas inoculadas com BAs; ainda, a inoculação com as BAs de modo geral, considerando todas as mudas inoculadas, diminuiu a peroxidação lipídica das folhas das mudas de *C. canjerana* em relação às mudas NIn (Figura 6B; Apêndice 5, contrastes J e K).

Mudas em DH com NO tiveram maior concentração de S-nitrosotióis que mudas NIn CC e que mudas NIn DH, e as mudas inoculadas com as BAs em DH tiveram menos RSNO que mudas NIn CC (Figura 6C; Apêndice 5, contrastes C, F e B). A inoculação com as BAs, nas mudas tanto em CC quanto em DH e tanto sem quanto com NO, diminuiu a concentração de RSNO das folhas das mudas de *C. canjerana* quando comparadas às mudas NIn (Figura 6C; Apêndice 5, contraste K).

A inoculação com as BAs diminuiu a massa seca da raiz das mudas em DH em relação às NIn CC (Figura 7A; Tabela 6; Apêndice 6, contrastes B e D). O DH diminuiu a massa seca da parte aérea das mudas de todos os tratamentos (Figura 7B; Tabela 6; Apêndice 6, contraste A-D). E, considerando todas as mudas inoculadas com as BAs, estas tiveram menor MSPA do que as mudas NIn (Figura 7B; Tabela 6; Apêndice 6, contraste K).

As mudas de *C. canjerana* inoculadas com as BAs e tratadas com NO em DH tiveram maior R/PA do que as mudas NIn CC (Figura 7C; Tabela 6; Apêndice 6, contraste D). Além disso, ao considerar todas as mudas inoculadas, a razão R/PA foi maior que das mudas NIn (Figura 7C; Tabela 6; Apêndice 6, contraste K). O DH diminuiu a massa seca das mudas de *C. canjerana* em todos os tratamentos quando comparados às mudas NIn CC, e o mesmo foi observado para a MSF (Figuras 7D e E; Tabela 6; Apêndice 6, contrastes A-D). Considerando a fração da massa foliar, as mudas em DH com NO tiveram menor investimento em massa das folhas por massa da planta quando comparadas às mudas NIn CC (Figura 7F; Tabela 6; Apêndice 6, contraste C).

Todos os tratamentos em DH tiveram menor AF que as mudas NIn CC (Figura 7G; Tabela 6; Apêndice 6, contraste A-D). Já a RAF não foi afetada pelo déficit hídrico, mas as mudas em DH inoculadas com ambas as BAs tiveram maior RAF do que mudas NIn DH (Figura 7H; Tabela 6; Apêndice 6, contrastes E, H e I).



**Figura 7.** Parâmetros biométricos de mudas de *Cabralea canjerana* (n = 10). A: Massa seca (MS) da raiz; B: MS da parte aérea; C: Razão da massa da raiz pela massa da parte aérea; D: MS da planta; E: MS das folhas; F: Fração da massa foliar; G: Área foliar total; H: Razão da área foliar. NO: Mudanças em solo com aplicação de nanopartículas contendo doador de óxido nítrico (NO); Nln: mudas não inoculadas com bactérias associativas (BAs); BAs: mudas inoculadas com BAs; ZK: mudas inoculadas com *Bacillus velentis*, sem NO e com NO; Ab-V5: mudas inoculadas com *Azospirillum brasilense*, sem NO e com NO; CC: mudas em solo na capacidade de campo; DH: mudas sob déficit hídrico. Barras quadriculadas: mudas Nln tanto em solo na CC quanto em DH, sem NO e com NO; barra hachurada: mudas inoculadas com BAs tanto em solo na CC quanto em DH, sem NO e com NO. \* = p<0,05; \*\* = <0,01 (Contrastes ortogonais: Nln CC x cada tratamento em DH; após linha tracejada: Nln x BAs). † = p<0,05; †† = p<0,01 (Contrastes ortogonais: Nln DH x cada tratamento em DH).

## 2.4. DISCUSSÃO

### 2.4.1. Trocas Gasosas

A inoculação das mudas de *H. popayanensis* com as BAs permitiu a manutenção da  $A_{\max}$  em DH apesar da diminuição da  $g_s$  nesta espécie. O fechamento estomático observado nas mudas em DH pode ser resultado das respostas ao ABA (Bray, 1997; Desikan *et al.*, 2004), e caracteriza uma resposta adaptativa ao DH, reduzindo a perda excessiva de água (García-Mata e Lamattina, 2001). A inoculação com as BAs se mostrou importante para que estas mudas mantivessem taxas fotossintéticas que permitam crescimento e desenvolvimento sem aumentar a perda de água pelos estômatos.

As BAs produzem diversos hormônios vegetais, e estudos demonstram a produção de citocininas tanto por bactérias do gênero *Bacillus* sp. (Arkhipova *et al.*, 2005; Ortíz-Castro *et al.*, 2008) quanto *Azospirillum* sp. (Tien *et al.* 1979). As citocininas podem ter vários efeitos sobre o metabolismo das plantas, como investimento em massa da parte aérea e de raízes (Arkhipova *et al.*, 2005), crescimento de pelos nas raízes (Tien *et al.*, 1979), e fotossíntese (Shao *et al.*, 2010). Shao *et al.* (2010) em estudo com plantas de milho submetidas ao déficit hídrico induzido por PEG em solução hidropônica observaram que a aplicação da citocinina exógena, 6-benzinamilopurina, resultou no aumento da eficiência da cadeia de transporte de elétrons da fotossíntese, protegendo as plantas dos danos causados pelo déficit hídrico. Portanto, é possível que a produção de citocininas por ZK e Ab-V5 em associação com mudas de *H. popayanensis* tenha aumentado a eficiência fotossintética destas.

Já as mudas de *C. canjerana*, espécie tolerante à sombra, com NO tiveram maior assimilação de CO<sub>2</sub>, independente da condição hídrica e da presença ou não das BAs. Isto indica que o nicho que as mudas ocupam pode alterar as respostas à inoculação e à aplicação de NPs contendo doador de NO. Kong *et al.* (2016) em estudo com algodão sob estresse salino verificaram que a aplicação foliar de SNP como doador de NO resultou na diminuição da degradação da clorofila e aumento na expressão do gene LHCB (complexo antena do FSII), retardando a senescência foliar. E Khairy *et al.* (2016) verificaram também com SNP como doador de NO, que os conteúdos da Rubisco e da Rubisco ativase em plantas de tabaco foram maiores.

Assim, o aumento da  $A_{\max}$  nas mudas de *C. canjerana* com NO indica que a aplicação de NO exógeno no solo destas mudas pode ter aumentado a eficiência tanto da cadeia de transporte de elétrons quanto das reações de carboxilação da fotossíntese.

Além de aumentar a  $A_{\max}$  das mudas de *C. canjerana*, a aplicação de NO resultou na maior condutância estomática, o que permite maior influxo de  $\text{CO}_2$  favorecendo a fixação deste carbono, sendo que uma das principais limitações à fotossíntese em plantas em DH é a diminuição da disponibilidade de  $\text{CO}_2$  devido ao fechamento estomático (Flexas *et al.*, 2004). Silveira *et al.* (2016) também encontraram maior abertura estomática em cana-de-açúcar submetida ao déficit hídrico com aplicações foliares de GSNO em concentrações acima de 100  $\mu\text{M}$ . Desikan *et al.* (2004) em revisão sobre o papel do NO nas células guarda salienta que em altas concentrações (0,5 a 2 mM), o NO atua na abertura estomática, enquanto que em concentrações menores estimula o fechamento estomático. Ainda, Wang *et al.* (2015) em estudo com mutantes de *Arabidopsis* que acumularam altas concentrações de NO nas células-guarda tiveram insensibilidade ao ABA, impedindo o fechamento estomático. Isto indica que o NO que foi aplicado no solo destas mudas pode ter chegado às células guarda em concentração suficiente para estimular a abertura estomática.

O efeito do NO sobre a  $g_s$  também foi observado nas mudas de *H. popayanensis* NIn, pois mesmo em DH estas mudas tiveram a mesma  $g_s$  que mudas NIn CC. Entretanto, as mudas inoculadas com as BAs e com NO apresentaram queda na  $g_s$ , indicando uma possível regulação do conteúdo de NO nas folhas. A principal enzima envolvida na regulação dos níveis endógenos de NO é a S-nitrosoglutationa redutase. Esta enzima regula os níveis de S-nitrosoglutationa, que tem sido considerada a principal reserva e fonte de NO nas células vegetais (Salgado *et al.*, 2013). Em situações de estresse a atividade desta enzima pode ser ativada, reduzindo os níveis de GSNO e, portanto, de maneira indireta, os níveis de NO na célula (Kubienová *et al.*, 2013; Salgado *et al.*, 2013). Em associação com mudas de *H. popayanensis* a estirpe ZK pode ter estimulado a ativação desta enzima, regulando negativamente o conteúdo de NO nas folhas. Contudo, apesar da queda na abertura estomática, as mudas associadas às BAs, tanto sem quanto com NO, mantiveram a  $A_{\max}$  em relação às mudas NIn CC. Isto aumentou a  $\text{EUA}_i$  destas plantas tanto devido à  $g_s$  quanto à  $A_{\max}$ , demonstrando uma vantagem da

associação com estas estirpes na assimilação de C e consequente crescimento, especialmente em condições de déficit hídrico (Condon *et al.*, 2002), o que aumenta a possibilidade de sobrevivência em sítios de reflorestamento.

Mudas de *H. popayanensis* associadas às BAs tiveram diminuição na  $C_i/C_a$  além de maior eficiência instantânea de carboxilação ( $k$ ). Tiepo *et al.* (2018) em experimento com déficit hídrico com mudas de *Cariniana estrellensis* (Raddi) encontraram maior assimilação de CO<sub>2</sub> e maior eficiência instantânea de carboxilação para mudas associadas a Ab-V5 comparadas às mudas não inoculadas. Estes resultados de *H. popayanensis* e os encontrados por Tiepo *et al.* (2018) indicam que as BAs podem aumentar a eficiência das reações de carboxilação da fotossíntese, o que pode resultar em maior tolerância ao DH.

#### 2.4.2. Conteúdo Relativo de Água

A inoculação com as BAs, e o tratamento simultâneo com BAs e NO evitou a diminuição do CRA das folhas de *H. popayanensis* em relação às mudas NIn CC, e aumentou o CRA destas em relação às mudas NIn em DH. Isto indica que as mudas inoculadas tanto com ZK quanto com Ab-V5 podem ter apresentado maior absorção de água pelas raízes, o que resultou na manutenção da hidratação e turgor celular, resultando na manutenção do seu metabolismo fotossintético. Tanto *Bacillus* sp. quanto *A. brasilense* podem produzir auxinas (Goes *et al.*, 2012; Fukami *et al.*, 2018a), estimulando o desenvolvimento de raízes laterais e pelos que auxiliam na absorção de água e nutrientes (Bashan *et al.*, 2004; Dobbelaere *et al.*, 1999). Asari *et al.* (2017) encontraram em *Arabidopsis thaliana* associada a *Bacillus amyloliquefaciens* UCMB5113 crescimento de pelos nas raízes e alongamento das raízes laterais possivelmente associados à produção tanto de auxinas quanto de citocininas pela bactéria. Bactérias dos gêneros *Azospirillum* e *Bacillus* podem também produzir exopolissacarídeos (Al-Ali *et al.*, 2018; Oliveira *et al.*, 2017) que podem formar agregados de solo na raiz, permitindo maior absorção de água pela planta (Alami *et al.*, 2000; Sandhya *et al.*, 2010).

Além disso, o tratamento simultâneo com NO e com as BAs pode ter resultado em efeitos sinérgicos das auxinas produzidas pelas bactérias com o NO exógeno. Diversos estudos demonstraram o papel do NO nas respostas às auxinas no desenvolvimento das raízes, incluindo formação de raízes laterais e pelos

(Pagnussat *et al.*, 2002; Correa-Aragunde *et al.*, 2004; Creus *et al.*, 2005). De modo geral, a presença de auxinas aumenta a produção de NO (revisado por Freschi, 2013), entretanto, no presente estudo é possível que a presença de auxinas produzidas pelas BAs e a presença de NO exógeno podem ter interagido de modo a afetar o desenvolvimento estrutural da raiz, permitindo que as mudas tivessem maior absorção de água.

#### 2.4.3. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Dienos Conjugados E S-Nitrosotióis

A inoculação com as BAs e o NO aumentaram o conteúdo foliar de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> das mudas de *H. popayanensis*. Em relação às mudas de *C. canjerana*, o tratamento com doador de NO, tanto sem BAs quanto com BAs aumentou o conteúdo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nas folhas das mudas em DH. He *et al.* (2005) em ensaio com tiras epidérmicas de *Vicia faba* tratadas com SNP, um doador de NO, também detectaram aumento no conteúdo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Já a inoculação com BAs de modo geral diminui o conteúdo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ao aumentar a atividade de enzimas como catalase e ascorbato peroxidase (Damodaran *et al.*, 2014; Fukami *et al.*, 2018a), diferente do encontrado neste estudo. O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é uma ERO que atua como sinalizador em diversos processos metabólicos, incluindo respostas de tolerância ao déficit hídrico (Niu e Liao, 2016). Ashraf *et al.* (2015) encontraram em plantas de milho, cujas sementes foram tratadas com solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, uma melhora na resposta antioxidante tanto por vias enzimáticas quanto não enzimáticas. O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> atua interagindo com diferentes moléculas sinalizadoras como hormônios e NO (Niu e Liao, 2016), o que pode ter relação com o aumento da concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nas folhas das mudas de ambas as espécies inoculadas com as bactérias e com aplicação de NO exógeno.

A peroxidação lipídica das folhas de *H. popayanensis* diminuiu em DH, exceto para as mudas NIn com NO, entretanto não houve aumento deste dano nestas mudas. Mas, de modo geral a inoculação com as BAs diminuiu a concentração de dienos conjugados das folhas das mudas de *H. popayanensis*. Isto sugere que as bactérias podem manter o equilíbrio redox nas folhas das mudas desta espécie intolerante à sombra. Diversos estudos demonstram o aumento da resposta antioxidante em plantas inoculadas com bactérias (Fukami *et al.*, 2018a; 2018b; Heidari e Golpayegami, 2012; Wang *et al.*, 2012) e a diminuição do dano oxidativo é especialmente importante em condições de estresse.

Já nas mudas de *C. canjerana*, o DH aumentou a peroxidação lipídica das folhas das mudas NIn e a inoculação com as BAs e a aplicação de NO em conjunto com as BAs diminuíram a concentração foliar de dienos conjugados, diminuindo o efeito danoso do DH. O NO pode estimular a atividade de enzimas antioxidantes como superóxido dismutase (SOD) (Shi *et al.*, 2005) e também atuar na remoção direta de espécies reativas de oxigênio (Beligni e Lamattina, 2002), resultando em menor dano às membranas e a outros componentes celulares. Entretanto, as mudas NIn com NO em DH tiveram maior concentração de dienos conjugados tanto em relação às mudas NIn CC quanto às mudas NIn DH. É possível que a presença das BAs nas mudas de *C. canjerana* tenha resultado em mecanismos de regulação do NO nos folíolos, evitando o possível aumento da concentração de espécies mais reativas como peroxinitrito, que pode aumentar a peroxidação lipídica (Vandelle e Delledonne, 2011). Isto pode ter contribuído para um efeito sinérgico e benéfico do tratamento com as BAs em conjunto com o NO.

A aplicação de NPs de NO no solo das mudas não inoculadas e das associadas às BAs, especialmente Ab-V5, em DH aumentou os níveis de S-nitrosotióis (RSNO) nas folhas de *H. popayanensis*. Isto demonstra que o NO liberado pelo MSA contido nas nanopartículas de quitosana está sendo transportado para a parte aérea destas mudas quando em DH, e que a aplicação de um doador de NO no solo com restrição hídrica possibilitou que o conteúdo de S-nitrosotióis foliares fosse igual das mudas controle. Além disso, ao comparar as plantas em DH, verifica-se que as mudas inoculadas com Ab-V5 tiveram maior concentração de RSNO, o que pode indicar que esta bactéria aumentou o conteúdo de NO nestas mudas. Molina-Favero *et al.* (2008) verificaram a produção de NO por *A. brasilense* Sp245 inoculada em tomate, sugerindo que esta bactéria pode sintetizar NO influenciando o metabolismo das plantas.

A aplicação de NPs de NO no solo das mudas de *C. canjerana* não inoculadas em DH também aumentou a concentração de RSNO nas folhas. Mas, diferente do encontrado nas mudas de *H. popayanensis*, a associação com Ab-V5 não aumentou o conteúdo de S-nitrosotióis. A S-nitrosilação é um dos principais modos de ação do NO em células, sendo uma modificação pós-tradução reversível e regulada envolvida em diversas respostas das plantas, inclusive a estresses abióticos (Freschi, 2013). Considerando as mudas de *C. canjerana* associadas a Ab-V5 e com NO, pode-se verificar que houve diminuição no conteúdo de S-nitrosotióis,

indicando que em associação com estas mudas esta estirpe de BA pode ter ativado mecanismos de regulação do conteúdo de S-nitrosotióis.

#### 2.4.4. Parâmetros Biométricos

Considerando todas as mudas de *H. popayanensis* com aplicação de NPs de NO, estas tiveram maior massa seca da parte aérea, maior massa seca das folhas e da planta inteira, além de maior área foliar total que as mudas sem NO, indicando que o NO diminuiu a abscisão foliar. Lopes-Oliveira *et al.* (2019), em estudo com mudas de *H. popayanensis* em viveiro sob condições de alta luminosidade, verificaram que a aplicação de NPs contendo S-nitroso-MSA no substrato das mudas aumentou a área foliar, a altura do caule, o diâmetro do caule, a massa seca das folhas e a massa seca do caule. Este crescimento foi observado tanto em relação às mudas sem NO, quanto em relação às mudas tratadas com S-nitroso-MSA não encapsulado e às mudas com MSA não nitrosilado contido em NPs (Lopes-Oliveira *et al.*, 2019). Isto demonstra que o NO exógeno favorece o aumento e a manutenção de tecido fotossintetizante nas mudas desta espécie independente das condições de luminosidade, já que no presente estudo as mudas estavam expostas a uma intensidade luminosa de cerca de  $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (ao meio-dia), enquanto no estudo de Lopes-Oliveira *et al.* (2019) a PAR máxima chegava a  $1.800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

As mudas de *H. popayanensis* NIn com NO em DH e as NIn DH tiveram aumento da razão da massa da raiz pela PA, o que pode indicar uma resposta ao ABA (Saab *et al.*, 1990; Sharp *et al.*, 1994), e pode aumentar a área de absorção de água em razão da superfície transpirante. Bogeat-Triboulot *et al.* (2007) observaram que mudas da espécie arbórea *Populus euphratica* Oliv. submetidas a condições de seca amenas em casa de vegetação tiveram redução do crescimento do caule e manutenção do crescimento da raiz, aumentando a razão raiz/parte aérea e mantendo o status hídrico da planta.

A inoculação com as BAs, tanto sem NO quanto com NO, diminuiu a massa seca da raiz em relação às mudas NIn CC nas mudas de *C. canjerana*. A massa seca da planta, das folhas e da parte aérea e a área foliar total foi menor nas mudas em DH em todos os tratamentos comparados às mudas do controle. A diminuição do investimento em biomassa das mudas de *C. canjerana* pode resultar em economia

de água e carbono, já que o crescimento pode diminuir antes da queda da fotossíntese em plantas submetidas ao déficit hídrico, devido principalmente à diminuição no turgor das células (Hsiao *et al.*, 1976; Amthor e McCree, 1990). Mesmo que estas mudas não tenham apresentado queda no CRA dos folíolos o DH afetou negativamente seu crescimento, o que pode ter relação com uma possível perda de turgor nas raízes.

Apesar de a inoculação com as BAs não ter resultado em incremento de biomassa, a razão da área foliar das mudas de *C. canjerana* inoculadas com BAs em DH foi maior do que daquelas não inoculadas. Isto sugere que a inoculação com as BAs reduziu a queda das folhas destas mudas, o que pode ter resultado na manutenção da área fotossintetizante por massa seca da planta e pode resultar em maiores taxas fotossintéticas da planta como um todo, aumentando o crescimento destas mudas em relação às NIn no longo prazo (Poorter e Remkes, 1990). Sob restrição hídrica, a maior proporção de folha em razão da massa da planta pode aumentar a possibilidade de danos fotoinibitórios devido à maior área de absorção de luz. Entretanto, as folhas de *C. canjerana* possuem tricomas que podem diminuir estes danos (Galmés *et al.*, 2007), portanto, aumentando a capacidade competitiva destas mudas no campo.

## 2.5. CONCLUSÕES

A inoculação com BPCPs e o tratamento com nanopartículas de quitosana/TPP contendo S-nitroso-MSA afetaram as características fisiológicas, bioquímicas e de crescimento das mudas de *H. popayanensis* e *C. canjerana* de modo a torná-las mais tolerantes ao déficit hídrico moderado. Em algumas respostas, o efeito foi sinérgico. Assim, o uso destas técnicas pode ser eficiente para produção de mudas mais tolerantes ao DH.

As bactérias inoculadas nas mudas da espécie intolerante à sombra, *H. popayanensis*, tiveram efeitos positivos na fotossíntese e nos níveis de S-nitrosotióis das folhas. Ainda, foram observados efeitos sinérgicos sobre o conteúdo relativo de água das folhas destas mudas em DH. Já para a espécie tolerante à sombra, *C. canjerana*, a associação com as BAs diminuiu a peroxidação lipídica das folhas, resposta em que também foi observado efeito sinérgico da inoculação com o NO. O tratamento com as NPs de NO nestas mudas aumentou os níveis de S-nitrosotióis

nas folhas e aumentou a assimilação líquida de CO<sub>2</sub>. Estes resultados demonstram que as respostas das mudas podem mudar de acordo com o grau de tolerância à sombra das plantas, entretanto, a observação do efeito sinérgico entre as BAs e o NO em ambas as espécies indica que esta pode ser uma ferramenta importante para produção de mudas de melhor qualidade e, portanto, com maior capacidade competitiva. A partir deste estudo, que é um dos pioneiros nesta área envolvendo espécies arbóreas nativas, foi possível observar o quão promissor é o investimento em pesquisas envolvendo a utilização de BAs e NPs de NO no cultivo de mudas que serão utilizadas em reflorestamentos.

### **Agradecimentos**

Os autores agradecem ao Programa de pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina (UEL), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela concessão de bolsa de estudo ao primeiro autor, ao Laboratório de Biodiversidade e Restauração de Ecossistemas da UEL por disponibilizarem as sementes utilizadas neste estudo, à Prof. Amedea Barozzi Seabra e aos alunos do Laboratório Bionano Metals (UFABC) pelo fornecimento das nanopartículas doadoras de NO e ao Prof. André Martinez (Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, UEL) pelo fornecimento das estirpes bacterianas.

### **Financiamento**

Este estudo foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (445290/2014-5). O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

### **Conflito de interesses**

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

## Contribuições dos autores

RSM e JAP conceberam o estudo e planejaram o delineamento experimental. MFH adquiriu, analisou e interpretou os dados. MFH, RSM e JAP escreveram e revisaram criticamente o manuscrito e o aprovaram para ser submetido.

## REFERÊNCIAS

- Al-Ali, A., Deravel, J., Krier, F., Béchet, M., Ongena, M., Jacques, P., 2018. Biofilm formation is determinant in tomato rhizosphere colonization by *Bacillus velezensis* FZB42. *Environmental Science and Pollution Research* 25, 29910-29920.
- Alami, Y., Achouak, W., Marol, C., Heulin, T., 2000. Rhizosphere Soil Aggregation and Plant Growth Promotion of Sunflowers by an Exopolysaccharide-Producing *Rhizobium* sp. Strain Isolated from Sunflower Roots. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 3393-3398.
- Amthor, J.S., McCree, K.J., 1990. Carbon balance of stressed plants: a conceptual model for integrating research results. New York, NY, USA: Wiley-Liss.
- Arkhipova, T.N., Veselov, S.U., Melentiev, A.I., Martynenko, E.V., Kudoyarova, G.R., 2005. Ability of bacterium *Bacillus subtilis* to produce cytokinins and to influence the growth and endogenous hormone content of lettuce plants. *Plant and Soil* 272, 201-209.
- Asari, S., Tarkowská, D., Rolčík, J., Novák, O., Palmero, D.V., Bejai, S., Meijer, J., 2017. Analysis of plant growth-promoting properties of *Bacillus amyloliquefaciens* UCMB5113 using *Arabidopsis thaliana* as host plant. *Planta* 245, 15-30.
- Ashraf, M.A., Rasheed, R., Hussain, I., Iqbal, M., Haider, M.Z., Parveen, S., Sajid, M.A., 2015. Hydrogen peroxide modulates antioxidant system and nutrient relation in maize (*Zea mays* L.) under water-deficit conditions. *Archives of Agronomy and Soil Science* 61, 507-523.
- Astier, J., Lindermayr, C., 2012. Nitric Oxide-Dependent Posttranslational Modification in Plants: An Update. *International Journal of Molecular Sciences* 13, 15193-15208.
- Bashan, Y., Holguin, G., de-Bashan, L., 2004. *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). *Canadian Journal of Microbiology* 50, 521-577.
- Beligni, M.V., Lamattina, L., 2002. Nitric oxide interferes with plant photo-oxidative stress by detoxifying reactive oxygen species. *Plant, Cell and Environment* 25, 737-748.
- Bogeat-Triboulout, M-B., Brosché, M., Renaut, J., Jouve, L., Le Thiec, D., Fayyaz, P., Vinocur, B., Witters, E., Laukens, K., Teichmann, T., Altman, A., Hausman, J-F., Polle, A., Kangasjärvi, J., Dreyer, E., 2007. Gradual Soil Water Depletion Results in Reversible Changes of Gene Expression, Protein Profiles, Ecophysiology, and Growth Performance in *Populus euphratica*, a Poplar Growing in Arid Regions. *Plant Physiology* 143, 876-892.
- Bottini, R., Fulchieri, M., Pearce, D., Pharis, R.P., 1989. Identification of gibberellins A1, A3, and iso-A3 in cultures of *Azospirillum lipoferum*. *Plant Physiology* 90, 45-47.
- Boveris, A., Cadenas, E., Chance, B., 1980. Low level chemiluminescence of the lipoxygenase reaction. *Photobiochemistry and Photobiophysics* 1, 175-182.
- Bray, E.A. 1997. Plant responses to water deficit. *Trends in Plant Sciences* 2, 48-54.

- Chen, Y.P., Rekha, P.D., Arun, A.B., Shen, F.T., Lai, W.-A., Young, C.C., 2006. Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. *Applied Soil Ecology* 34, 33-41.
- Cohen, A.C., Bottini, R., Piccoli, P.N., 2008. *Azospirillum brasilense* Sp. 245 produces ABA in chemically-defined culture medium and increases ABA content in *Arabidopsis* plants. *Plant Growth Regulation* 54, 97–103.
- Condon, A.G., Richards, R.A., Rebetzke, G.J., Farquhar, G.D., 2002. Improving Intrinsic Water-Use Efficiency and Crop Yield. *Crop Sci.* 42, 122-131.
- Correa-Aragunde, N., Graziano, M., Lamattina, L., 2004. Nitric oxide plays a central role in determining lateral root development in tomato. *Planta* 218, 900–905.
- Creus, C.M., Sueldo, R.J., Barassi, C.A., 2004. Water relations and yield in *Azospirillum*-inoculated wheat exposed to drought in the field. *Can. J. Bot.* 82, 273-281.
- Creus, C.M., Graziano, M., Casanovas, E.M., Pereyra, M.A., Simontacchi, M., Puntarulo, S., Barassi, C.A., Lamattina, L., 2005. Nitric Oxide is Involved in the *Azospirillum brasilense*-induced Lateral Root Formation in Tomato. *Planta* 221, 297-303.
- Damodaran, T., Rai, R.B., Jha, S.K., Kannan, R., Pandey, B.K., Sah, V., Mishra, V.K., Sharma, D.K., 2014. Rhizosphere and Endophytic Bacteria for Induction for Salt Tolerance in Gladiolus Grown in Sodic Soils. *Journal of Plant Interactions* 9, 577-584.
- Desikan, R., Cheung, M.K., Bright, J., Henson, D., Hancock, J.T., Neill, S.J., 2004. ABA, hydrogen peroxide and nitric oxide signalling in stomatal guard cells. *Journal of Experimental Botany* 55, 205-212.
- Dobbelaere, S., Croonenborghs, A., Thys, A., Vande Broek, A., and Vanderleyden, J., 1999. Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasilense* wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat. *Plant Soil*, 212: 155-164.
- Dunlap, C.A., Kim, S.J., Kwon, S.W., Rooney, A.P., 2016. *Bacillus velezensis* is not a later heterotypic synonym of *Bacillus amyloliquefaciens*; *Bacillus methylotrophicus*, *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* and '*Bacillus oryzicola*' are later heterotypic synonyms of *Bacillus velezensis* based on phylogenomics. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 66, 1212-1217.
- Ellison, D., Morris, C.E., Locatelli, B., Sheil, D., Cohen, J., Murdiyarso, D., Gutierrez, V., vanNoordwijk, M., Creed, I.F., Pokorny, J., Gaveau, D., Spracklen, D.V., Tobella, A.B., Ilstedt, U., Teuling, A.J., *et al.*, 2017. Trees, forests and water: Cool insights for a hot world. *Global Environment Change* 43, 51-61.
- Flexas, J., Bota, J., Loreto, F., Cornic, G., Sharkey, T.D., 2004. Diffusive and Metabolic Limitations to Photosynthesis under Drought and Salinity in C3 Plants. *Plant Biology* 6, 269-279.
- Freschi, L., 2013. Nitric oxide and phytohormone interactions: current status and perspectives. *Frontiers in Plant Science* 4, 398-419.
- Fukami, J., Abrantes, J.L.F., del Cerro, P., Nogueira, M.A., Ollero, F.J., Megías, M., Hungria, M., 2018a. Revealing strategies of quorum sensing in *Azospirillum brasilense* strains Ab-V5 and Ab-V6. *Arch. Microbiol.* 200, 47–56.
- Fukami, J., Cerezini, P., Hungria, M., 2018b. *Azospirillum*: benefits that go far beyond biological nitrogen fixation. *AMB Expr.* 8, 73-85.
- Galmés, J., Medrano, H., Flexas, J., 2007. Photosynthesis and photoinhibition in response to drought in a pubescent (var. *minor*) and a glabrous (var. *palaui*) variety of *Digitalis minor*. *Environmental and Experimental Botany* 60, 105-111.

- García-Mata, C.G., Lamattina, L., 2001. Nitric oxide induces stomatal closure and enhances the adaptive plant responses against drought stress. *Plant Physiology* 126, 1196–1204.
- Goes, K.C.G.P., Fisher, M.L.C., Cattelan, A.J., Nogueira, M.A., Carvalho, C.G.P., Oliveira, A.L.M., 2012. Biochemical and molecular characterization of high population density bacteria isolated from sunflower. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 22, 437–447.
- Groß, F., Durner, J., Gaupels, F., 2013. Nitric oxide, antioxidants and prooxidants in plant defence responses. *Frontiers in Plant Science* 4, 419–433.
- He, J.M., Xu, H., She, X.P., Song, X.G., Zhao, W.M., 2005. The role and the interrelationship of hydrogen peroxide and nitric oxide in the UV-B induced stomatal closure in broad bean. *Funct Plant Biol* 32: 237–247
- Heidari, M., Golpayegani, A., 2012. Effects of water stress and inoculation with plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on antioxidant status and photosynthetic pigments in basil (*Ocimum basilicum* L.). *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences* 11, 57–61.
- Hill, B.G., Dranka, B.P., Bailey, S.M., Lancaster, J.R.Jr., Darley-Usmar, V.M., 2010. What part of NO don't you understand. Some answers to the cardinal questions in nitric oxide biology. *Journal of Biological Chemistry* 285, 19699–19704.
- Hsiao, T.C., Acevedo, E., Fereres, E., Henderson, D.W., 1976. Water stress, growth, and osmotic adjustment. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences* 273, 479–500.
- Hungria, M., Campo, R.J., Souza, E.M., Pedrosa, F.O., 2010. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. *Plant Soil* 331, 413–425.
- IAPAR, 2018. Agrometeorologia – Dados diários de Londrina. <http://www.iapar.br/pagina-1828.html> (acessado em Setembro de 2019).
- Kaiser, W.M., Planchet, E., Rümer, S., 2010. Nitrate reductase and nitric oxide. *Annual Plant Reviews* 42, 127–145.
- Khairy, A.I.H., Oh, M.J., Lee, S.M., Kim, D.S., Roh, K.S., 2016. Nitric oxide overcomes Cd and Cu toxicity in in vitro-grown tobacco plants through increasing contents and activities of rubisco and rubisco activase. *Biochimie Open* 2, 41–51.
- Kong, X., Wang, T., Weijang, L., Tang, W., Zhang, D., Dong, H., 2016. Exogenous nitric oxide delays salt-induced leaf senescence in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Acta Physiologiae Plantarum* 38, 61–69.
- Kubienová, L., Kopečný, D., Tylichová, M., Briozzo, P., Skopalová, J., Sebelá, M., Navrátil, M., Tache, R., Luhová, L., Barroso, J.B., Petrivalsky, M., 2013. Structural and functional characterization of a plant S-nitrosoglutathione reductase from *Solanum lycopersicum*. *Biochimie* 95, 889–902.
- Lopes-Oliveira, P.J., Gomes, D.G., Pelegrino, M.T., Bianchini, E., Pimenta, J.A., Stolf-Moreira, R., Seabra, A.B., Oliveira, H.C., 2019. Effects of nitric oxide-releasing nanoparticles on neotropical tree seedlings submitted to acclimation under full sun in the nursery. *Scientific Reports* 9, 17371.
- Malhi, Y., Aragão, L.E.O.C., Galbraith, D., Huntingford, C., Fisher, R., Zelazowski, P., Sitch, S., McSweeney, C., Meir, P., 2009. Exploring the likelihood and mechanism of a climate-change-induced dieback of the Amazon rainforest. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 106, 20610–20615.
- Meyer, C., Lea, U.S., Provan, F., Kaiser, W.M., Lillo, C., 2005. Is nitrate reductase a major player in the plant NO (nitric oxide) game? *Photosynthesis Research* 83, 181–189.

- Molina-Favero, C., Creus, C.M., Simontacchi, M., Puntarulo, S., Lamattina, L., 2008. Aerobic Nitric Oxide Production by *Azospirillum brasilense* Sp245 and Its Influence on Root Architecture in Tomato. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 21, 1001-1009.
- Niu, L., Liao, W., 2016. Hydrogen Peroxide Signaling in Plant Development and Abiotic Responses: Crosstalk with Nitric Oxide and Calcium. *Frontiers in Plant Science* 7, 230-244.
- Oliveira, A.L.M., Santos, O.J.A.P., Marcelino, P.R.F., Milani, K.M.L., Zuluaga, M.Y.A., Zucareli, C., Gonçalves, L.S.A., 2017. Maize inoculation with *Azospirillum brasilense* Ab-V5 cells enriched with exopolysaccharides and polyhydroxybutyrate results in high productivity under low N fertilizer input. *Frontiers in Microbiology* 8, 1–18.
- 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.
- Oliveira, R.S., Costa, F.R.C., van Baalen, E., de Jonge, A., Bittencourt, P.R., Almanza, Y., Barros, F.V., Córdoba, E.C., Fagundes, M.V., Garcia, S., Guimaraes, Z.T.M., Hertel, M., Schietti, J., Rodrigues-Souza, J., Poorter, L., 2018. Embolism resistance drives the distribution of Amazonian rainforest tree species along hydro-topographic gradients. *New Phytologist* 221, 1457-1465.
- Ortiz-Castro, R., Valencia-Cantero, E., López-Bucío, J., 2008. Plant growth promotion by *Bacillus megaterium* involves cytokinin signaling. *Plant Signaling & Behavior* 3, 263-265.
- Pagnussat, G.C., Simontacchi, M., Puntarulo, S., Lamattina, L., 2002. Nitric oxide is required for root organogenesis. *Plant Physiol.* 129, 954–956.
- Pfister, S., Bayer, P., Koehler, A., Hellweg, S., 2011. Environmental Impacts of Water Use in Global Crop Production: Hotspots and Trade-Offs with Land Use. *Environmental Science & Technology* 45, 5761-5768.
- Phillips, O.L., Aragão, L.E.O.C., Lewis, S.L., Fisher, J.B., Lloyd, J., López-González, G., Malhi, Y., Monteagudo, A., Peacock, J., Quesada, C.A., van der Heijden, G., Almeida, S., Amaral, I., Arroyo, L., Aymard, G. *et al.*, 2009. Drought sensitivity of the Amazon rainforest. *Science* 323, 1344–1347.
- Poorter, H., Remkes, C., 1990. Leaf area ratio and net assimilation rate of 24 wild species differing in relative growth rate. *Oecologia* 83, 553-559.
- Prakash, V., Singh, V.P., Tripathi, D.K., Sharma, S., Corpas, F.J., 2019. Crosstalk between nitric oxide (NO) and abscisic acid (ABA) signaling molecules in higher plants. *Environmental and Experimental Botany* 161, 41-49.
- Rezende, C.L., Scarano, F.R., Assad, E.D., Joly, C.A., Metzger, J.P., Strassburg, B.B.N., Tabarelli, M., Fonseca, G.A., Mittermeier, R.A., 2018. From hotspot to hopespot: An opportunity for the Brazilian Atlantic Forest. *Perspectives in Ecology and Conservation* 16, 208-214.
- Ribeiro, M.C., Metzger, J.P., Martensen, A.C., Ponzoni, F.J., Hirota, M.M., 2009. The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. *Biological Conservation* 142, 1141-1153.
- Rockel, P., Strube, F., Rockel, A., Wildt, J., Kaiser, W.M., 2002. Regulation of nitric oxide (NO) production by plant nitrate reductase *in vivo* and *in vitro*. *Journal of Experimental Botany* 53, 103–110.
- Rodríguez, H., Fraga, R., 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances* 17, 319–339.

- Ruiz-García, C., Béjar, V., Martínez-Checa, F., Llamas, I., Quesada, E., 2005. *Bacillus velezensis* sp. nov., a surfactant-producing bacterium isolated from the river Vélez in Málaga, southern Spain. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55, 191–195.
- Saab, I.N., Sharp, R.E., Pritchard, J., Voetberg, G.S., 1990. *Plant Physiology* 93, 1329-1336.
- 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, 89-98.
- Sandhya, V., Ali, Sk.Z., Grover, M., Reddy, G., Venkateswarlu, B., 2010. Effect of plant growth promoting *Pseudomonas* spp. on compatible solutes, antioxidant status and plant growth of maize under drought stress. *Plant Growth Regulation* 62, 21-30.
- Seabra, A.B., Rai, M., Durán, N., 2014. Nano carriers for nitric oxide delivery and its potential application in plant physiological process: A mini review. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology* 23, 1-10.
- Shao, R., Wang, K., Shanguan, Z., 2010. Cytokinin-induced photosynthetic adaptability of *Zea mays* L. to drought stress associated with nitric oxide signal: Probed by ESR spectroscopy and fast OJIP fluorescence rise. *Journal of Plant Physiology* 167, 472-479.
- Sharp, R.E., Wu, Y., Voetberg, G.S., Saab, I.N., LeNoble, M.E., 1994. Confirmation that abscisic acid accumulation is required for maize primary root elongation at low water potentials. *Journal of Experimental Botany* 45, 1743-1751.
- 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.
- Silva, F.C., Soares-Silva, L.H., 2000. Arboreal Flora of the Godoy Forest State Park, Londrina, PR. Brazil. *Edinb. J. Bot.* 57, 107-120.
- Silveira, N.M., Frungillo, L., Marcos, F.C.C., Pelegrino, M.T., Miranda, M.T., Seabra, A.B., Salgado, I., Machado, E.C., Ribeiro, R.V., 2016. Exogenous nitric oxide improves sugarcane growth and photosynthesis under water deficit. *Planta* 244, 181-190.
- Tien, T.M., Gaskins, M.H., Hubbell, D.H., 1979. Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of Pearl Millet (*Pennisetum americanum* L.). *Applied and Environmental Microbiology* 37, 1016–1024.
- Tiepo, A.N., Hertel, M.F., Rocha, S.S., Calzavara, A.K., Oliveira, A.L.M., Pimenta, J.A., Oliveira, H.C., Bianchini, E., Stolf-Moreira, R., 2018. Enhanced drought tolerance in seedlings of Neotropical tree species inoculated with plant growth-promoting bacteria. *Plant Physiology and Biochemistry* 130, 277-288.
- Trenberth, K.E., Dai, A., van der Schrier, G., Jones, P.D., Barichivich, J., Briffa, K.R., Sheffield, J., 2014. Global warming and changes in drought. *Nature Climate Change* 4, 17–22.
- Vandelle, E., Delledonne, M., 2011. Peroxynitrite formation and function in plants. *Plant Science* 181, 534-539.
- Vardharajula, S., Ali, S.Z., Grover, M., Reddy, G., Bandi, V., 2011. Drought-tolerant plant growth promoting *Bacillus* spp.: effect on growth, osmolytes and antioxidant status of maize under drought stress. *J. of Plant Interactions* 6, 1-14.
- Wang, C.-J., Yang, W., Wang, C., Gu, C., Niu, D.-D., Liu, H.-X., Wang, W.-P., Guo, J.-H., 2012. Induction of Drought Tolerance in Cucumber Plants by a Consortium of Three Plant Growth-Promoting Rhizobacterium Strains. *Plos One* 7, 1-10.

Wang, P., Du, Y., Hou, Y.J., Zhao, Y., Hsu, C.C., Yuan, F., Zhu, X., Tao, W.A., Song, C.P., Zhu, J.K., 2015. Nitric oxide negatively regulates abscisic acid signaling in guard cells by S-nitrosylation of OST1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 112, 613–618.

**Apêndice 1.** Teste F (valor de P) para contrastes entre tratamentos de mudas de *Heliocarpus popayanensis*. Os contrastes foram ortogonais e previamente estabelecidos. CC: Capacidade de campo; DH: Déficit hídrico; NIn: mudas não inoculadas com bactérias promotoras do crescimento em plantas; ZK: mudas associadas a *Bacillus* sp.; Ab-V5: mudas associadas a *Azospirillum brasilense*; S/NO: mudas em solo sem aplicação de nanopartículas contendo doador de óxido nítrico (NPs de NO); C/NO: mudas em solo com aplicação de NPs de NO.  $A_{max}$ : assimilação líquida de CO<sub>2</sub> ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ );  $g_s$ : condutância estomática ( $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ );  $E$ : transpiração ( $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ );  $EUA_i$ : eficiência intrínseca no uso da água ( $\mu\text{molCO}_2 \text{ molH}_2\text{O}^{-1}$ );  $C_i/C_a$ : razão concentração intercelular/concentração no ambiente de CO<sub>2</sub>;  $k$ : eficiência instantânea de carboxilação ( $\mu\text{molCO}_2 \text{ m}^{-2} \text{s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$ ). CRA: conteúdo relativo de água (%).

Contrastes		$A_{max}$	$g_s$	$E$	$EUA_i$	$C_i/C_a$	$k$	CRA
		F(P)						
<b>A</b>	(CC NIn S/NO) vs (DH NIn S/NO)	4,73 ( <b>0,033</b> )	6,74 ( <b>0,011</b> )	7,42 ( <b>0,008</b> )	3,42 (0,068)	1,89 (0,173)	3,12 (0,082)	18,2 ( <b>0,000092</b> )
<b>B</b>	(CC NIn S/NO) vs (DH ZK S/NO) (DH Ab-V5 S/NO)	2,97 (0,089)	7,3 ( <b>0,008</b> )	4,28 ( <b>0,042</b> )	11,8 ( <b>0,00098</b> )	9,88 ( <b>0,0024</b> )	0,335 (0,564)	13,9 ( <b>0,000504</b> )
<b>C</b>	(CC NIn S/NO) vs (DH NIn C/NO)	7,34 ( <b>0,0083</b> )	2,81 (0,098)	1,93 (0,169)	0,538 (0,466)	0,813 (0,37)	5,57 ( <b>0,021</b> )	9,06 ( <b>0,004154</b> )
<b>D</b>	(CC NIn S/NO) vs (DH ZK C/NO)(DH Ab-V5 C/NO)	0,493 (0,485)	5,89 ( <b>0,018</b> )	0,613 (0,436)	13,6 ( <b>0,00043</b> )	12,4 ( <b>0,00073</b> )	0,408 (0,525)	3,06 (0,086)
<b>E</b>	(DH NIn S/NO) vs (DH ZK S/NO)(DH Ab-V5 S/NO)	0,733 (0,394)	0,173 (0,679)	1,33 (0,252)	1,25 (0,267)	1,93 (0,169)	2,14 (0,147)	1,44 (0,236)
<b>F</b>	(DH NIn S/NO) vs (DH NIn C/NO)	0,166 (0,684)	0,996 (0,321)	1,96 (0,166)	6,5 ( <b>0,013</b> )	4,99 ( <b>0,028</b> )	0,234 (0,63)	1,59 (0,213)
<b>G</b>	(DH NIn S/NO) vs (DH ZK C/NO)(DH Ab-V5 C/NO)	3,73 (0,057)	0,679 (0,412)	6,3 ( <b>0,014</b> )	1,53 (0,22)	2,73 (0,103)	7,27 ( <b>0,0086</b> )	10,1 ( <b>0,0026</b> )
<b>H</b>	(DH NIn S/NO) vs (DH ZK S/NO)(DH ZK C/NO)	1,22 (0,274)	0,055 (0,815)	1,6 (0,21)	3,73 (0,057)	4,71 ( <b>0,033</b> )	4,14 ( <b>0,045</b> )	5,38 ( <b>0,025</b> )
<b>I</b>	(DH NIn S/NO) vs (DH Ab-V5 S/NO)(DH Ab-V5 C/NO)	2,75 (0,101)	0,986 (0,324)	5,6 ( <b>0,021</b> )	0,182 (0,671)	0,755 (0,388)	4,4 ( <b>0,039</b> )	4,25 ( <b>0,045</b> )
<b>J</b>	(CC NIn S/NO)(CC ZK S/NO)(CC Ab-V5 S/NO) (DH NIn S/NO)(DH ZK S/NO)(DH Ab-V5 S/NO) vs (CC NIn C/NO)(CC ZK C/NO)(CC Ab-V5 C/NO) (DH NIn C/NO)(DH ZK C/NO)(DH Ab-V5 C/NO)	0,189 (0,665)	0,595 (0,443)	6,7 ( <b>0,012</b> )	1,19 (0,279)	0,5 (0,482)	0,547 (0,462)	0,1 (0,753)
<b>K</b>	(CC NIn S/NO)(CC NIn C/NO) (DH NIn S/NO)(DH NIn C/NO) vs (CC ZK S/NO)(CC Ab-V5 S/NO)(CC ZK C/NO) (CC Ab-V5 C/NO)(DH ZK S/NO)(DH Ab-V5 S/NO) (DH ZK C/NO)(DH Ab-V5 C/NO)	8,36 ( <b>0,005</b> )	0,005 (0,944)	3,7 (0,058)	19 ( <b>0,000041</b> )	21,4 ( <b>0,000015</b> )	16,9 ( <b>0,000098</b> )	2,98 (0,091)

**Apêndice 2.** Teste F (valor de P) para contrastes entre tratamentos de mudas de *Heliocarpus popayanensis*. Os contrastes foram ortogonais e previamente estabelecidos. CC: Capacidade de campo; DH: Déficit hídrico; NIn: mudas não inoculadas com bactérias promotoras do crescimento em plantas; ZK: mudas associadas a *Bacillus* sp.; Ab-V5: mudas associadas a *Azospirillum brasilense*; S/NO: mudas em solo sem aplicação de nanopartículas contendo doador de óxido nítrico (NPs de NO); C/NO: mudas em solo com aplicação de NPs de NO. DC: dienos conjugados; MDA: malondialdeído; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: peróxido de hidrogênio; NO<sub>2</sub><sup>-</sup>: nitrito; RSNO: S-nitrosotióis.

Contrastes		DC	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	RSNO
		F (P)		
<b>A</b>	(CC NIn S/NO) vs (DH NIn S/NO)	4,99 (0,03)	11,2 (0,0016)	18,2 (0,000096)
<b>B</b>	(CC NIn S/NO) vs (DH ZK S/NO) (DH Ab-V5 S/NO)	10,2 (0,0026)	0,198 (0,659)	5,86 (0,019)
<b>C</b>	(CC NIn S/NO) vs (DH NIn C/NO)	0,893 (0,349)	0,983 (0,327)	1,86 (0,179)
<b>D</b>	(CC NIn S/NO) vs (DH ZK C/NO)(DH Ab-V5 C/NO)	14,3 (0,00045)	0,397 (0,532)	1,35 (0,252)
<b>E</b>	(DH NIn S/NO) vs (DH ZK S/NO)(DH Ab-V5 S/NO)	0,175 (0,678)	17,7 (0,00012)	6,74 (0,013)
<b>F</b>	(DH NIn S/NO) vs (DH NIn C/NO)	1,8 (0,186)	18,3 (0,00009)	8,87 (0,0046)
<b>G</b>	(DH NIn S/NO) vs (DH ZK C/NO)(DH Ab-V5 C/NO)	0,928 (0,34)	19,2 (0,000066)	14,2 (0,00047)
<b>H</b>	(DH NIn S/NO) vs (DH ZK S/NO)(DH ZK C/NO)	0,848 (0,362)	20,3 (0,00004)	2,32 (0,134)
<b>I</b>	(DH NIn S/NO) vs (DH Ab-V5 S/NO)(DH Ab-V5 C/NO)	0,212 (0,647)	16,7 (0,00017)	23,4 (0,000015)
<b>J</b>	(CC NIn S/NO)(CC ZK S/NO)(CC Ab-V5 S/NO) (DH NIn S/NO)(DH ZK S/NO)(DH Ab-V5 S/NO) vs (CC NIn C/NO)(CC ZK C/NO)(CC Ab-V5 C/NO) (DH NIn C/NO)(DH ZK C/NO)(DH Ab-V5 C/NO)	3,41 (0,071)	4,52 (0,039)	0,155 (0,696)
<b>K</b>	(CC NIn S/NO)(CC NIn C/NO) (DH NIn S/NO)(DH NIn C/NO) vs (CC ZK S/NO)(CC Ab-V5 S/NO)(CC ZK C/NO) (CC Ab-V5 C/NO)(DH ZK S/NO)(DH Ab-V5 S/NO) (DH ZK C/NO)(DH Ab-V5 C/NO)	14,6 (0,0004)	10,2 (0,0025)	0,288 (0,594)

**Apêndice 3.** Teste F (valor de P) para contrastes entre tratamentos de mudas de *Heliocarpus popayanensis*. Os contrastes foram ortogonais e previamente estabelecidos. CC: Capacidade de campo; DH: Déficit hídrico; NIn: mudas não inoculadas com bactérias promotoras do crescimento em plantas; ZK: mudas associadas a *Bacillus* sp.; Ab-V5: mudas associadas a *Azospirillum brasilense*; S/NO: mudas em solo sem aplicação de nanopartículas contendo doador de óxido nítrico (NPs de NO); C/NO: mudas em solo com aplicação de NPs de NO. R: massa seca (MS) da raiz; PA: MS parte aérea; R/PA: razão MS raiz/MS PA; P: MS planta; F: MS folhas.

Contrastes		PA	R/PA	P	F
		F (P)			
<b>A</b>	(CC NIn S/NO) vs (DH NIn S/NO)	0,026 (0,873)	6,17 ( <b>0,015</b> )	0,172 (0,679)	3,16 (0,08)
<b>B</b>	(CC NIn S/NO) vs (DH ZK S/NO) (DH Ab-V5 S/NO)	0,242 (0,624)	1,13 (0,291)	0,034 (0,855)	3,77 (0,056)
<b>C</b>	(CC NIn S/NO) vs (DH NIn C/NO)	0,051 (0,821)	5,24 ( <b>0,025</b> )	0,112 (0,739)	2,57 (0,114)
<b>D</b>	(CC NIn S/NO) vs (DH ZK C/NO)(DH Ab-V5 C/NO)	0,843 (0,362)	1,07 (0,304)	1,17 (0,283)	0,028 (0,868)
<b>E</b>	(DH NIn S/NO) vs (DH ZK S/NO)(DH Ab-V5 S/NO)	0,037 (0,849)	3,5 (0,066)	0,335 (0,564)	0,222 (0,639)
<b>F</b>	(DH NIn S/NO) vs (DH NIn C/NO)	0,0005 (0,982)	0,388 (0,535)	0,02 (0,887)	0,226 (0,636)
<b>G</b>	(DH NIn S/NO) vs (DH ZK C/NO)(DH Ab-V5 C/NO)	0,704 (0,404)	3,84 (0,054)	0,109 (0,742)	4,25 ( <b>0,043</b> )
<b>H</b>	(DH NIn S/NO) vs (DH ZK S/NO)(DH ZK C/NO)	0,306 (0,582)	5,24 ( <b>0,025</b> )	0,00007 (0,993)	2,16 (0,146)
<b>I</b>	(DH NIn S/NO) vs (DH Ab-V5 S/NO)(DH Ab-V5 C/NO)	0,007 (0,934)	2,36 (0,129)	0,062 (0,804)	1,09 (0,3)
<b>J</b>	(CC NIn S/NO)(CC ZK S/NO)(CC Ab-V5 S/NO) (DH NIn S/NO)(DH ZK S/NO)(DH Ab-V5 S/NO) vs (CC NIn C/NO)(CC ZK C/NO)(CC Ab-V5 C/NO) (DH NIn C/NO)(DH ZK C/NO)(DH Ab-V5 C/NO)	6,8 ( <b>0,011</b> )	0,138 (0,711)	5,16 ( <b>0,026</b> )	14 ( <b>0,0004</b> )
<b>K</b>	(CC NIn S/NO)(CC NIn C/NO) (DH NIn S/NO)(DH NIn C/NO) vs (CC ZK S/NO)(CC Ab-V5 S/NO)(CC ZK C/NO) (CC Ab-V5 C/NO)(DH ZK S/NO)(DH Ab-V5 S/NO) (DH ZK C/NO)(DH Ab-V5 C/NO)	2,53 (0,116)	10,7 ( <b>0,0016</b> )	0,294 (0,589)	6,67 ( <b>0,012</b> )

Continuação Apêndice 3. FMF: fração da massa foliar; AF: área foliar total; RAF: razão da área foliar.

Contrastes		FMF	AF	RAF
		F (P)		
<b>A</b>	(CC NIn S/NO) vs (DH NIn S/NO)	6,41 ( <b>0,014</b> )	1,8 (0,184)	5,26 ( <b>0,025</b> )
<b>B</b>	(CC NIn S/NO) vs (DH ZK S/NO) (DH Ab-V5 S/NO)	4,1 ( <b>0,047</b> )	3,91 (0,052)	5,71 ( <b>0,02</b> )
<b>C</b>	(CC NIn S/NO) vs (DH NIn C/NO)	4,45 ( <b>0,039</b> )	1,38 (0,244)	3,97 (0,05)
<b>D</b>	(CC NIn S/NO) vs (DH ZK C/NO)(DH Ab-V5 C/NO)	1,44 (0,233)	0,255 (0,615)	3,15 (0,08)
<b>E</b>	(DH NIn S/NO) vs (DH ZK S/NO)(DH Ab-V5 S/NO)	1,48 (0,228)	0,0004 (0,984)	0,478 (0,491)
<b>F</b>	(DH NIn S/NO) vs (DH NIn C/NO)	0,659 (0,419)	0,148 (0,701)	0,45 (0,505)
<b>G</b>	(DH NIn S/NO) vs (DH ZK C/NO)(DH Ab-V5 C/NO)	3,58 (0,063)	1,21 (0,276)	1,48 (0,227)
<b>H</b>	(DH NIn S/NO) vs (DH ZK S/NO)(DH ZK C/NO)	2,24 (0,139)	0,475 (0,493)	0,727 (0,397)
<b>I</b>	(DH NIn S/NO) vs (DH Ab-V5 S/NO)(DH Ab-V5 C/NO)	2,57 (0,113)	0,142 (0,708)	1,11 (0,296)
<b>J</b>	(CC NIn S/NO)(CC ZK S/NO)(CC Ab-V5 S/NO) (DH NIn S/NO)(DH ZK S/NO)(DH Ab-V5 S/NO) vs (CC NIn C/NO)(CC ZK C/NO)(CC Ab-V5 C/NO) (DH NIn C/NO)(DH ZK C/NO)(DH Ab-V5 C/NO)	1,26 (0,265)	10,6 ( <b>0,0017</b> )	0,341 (0,561)
<b>K</b>	(CC NIn S/NO)(CC NIn C/NO) (DH NIn S/NO)(DH NIn C/NO) vs (CC ZK S/NO)(CC Ab-V5 S/NO)(CC ZK C/NO) (CC Ab-V5 C/NO)(DH ZK S/NO)(DH Ab-V5 S/NO) (DH ZK C/NO)(DH Ab-V5 C/NO)	3,8 (0,055)	2,33 (0,131)	0,933 (0,338)

**Apêndice 4.** Teste F (valor de P) para contrastes entre tratamentos de mudas de *Cabralea canjerana*. Os contrastes foram ortogonais e previamente estabelecidos. CC: Capacidade de campo; DH: Déficit hídrico; NIn: mudas não inoculadas com bactérias promotoras do crescimento em plantas; ZK: mudas associadas a *Bacillus* sp.; Ab-V5: mudas associadas a *Azospirillum brasilense*; S/NO: mudas em solo sem aplicação de nanopartículas contendo doador de óxido nítrico (NPs de NO); C/NO: mudas em solo com aplicação de NPs de NO.  $A_{max}$ : assimilação líquida de  $CO_2$  ( $\mu mol\ m^{-2}\ s^{-1}$ );  $g_s$ : condutância estomática ( $mol\ m^{-2}\ s^{-1}$ );  $E$ : transpiração ( $mmol\ m^{-2}\ s^{-1}$ );  $EUA_i$ : eficiência intrínseca no uso da água ( $\mu mol\ CO_2\ mol\ H_2O^{-1}$ );  $C_i/C_a$ : razão concentração intercelular/concentração no ambiente de  $CO_2$ ;  $k$ : eficiência instantânea de carboxilação ( $\mu mol\ CO_2\ m^{-2}\ s^{-1}\ Pa^{-1}$ ). CRA: conteúdo relativo de água (%).

Contrastes		$A_{max}$	$g_s$	$E$	$EUA_i$	$C_i/C_a$	$k$	CRA
		F(P)						
<b>A</b>	(CC NIn S/NO) vs (DH NIn S/NO)	0,423 (0,517)	5,69 ( <b>0,019</b> )	6,44 ( <b>0,013</b> )	9,01 ( <b>0,0033</b> )	9,97 ( <b>0,0021</b> )	1,42 (0,236)	2,24 (0,141)
<b>B</b>	(CC NIn S/NO) vs (DH ZK S/NO) (DH Ab-V5 S/NO)	2,03 (0,157)	6,02 ( <b>0,016</b> )	6,3 ( <b>0,014</b> )	6,31 ( <b>0,013</b> )	6,26 ( <b>0,0138</b> )	0,011 (0,917)	0,018 (0,895)
<b>C</b>	(CC NIn S/NO) vs (DH NIn C/NO)	1,57 (0,213)	0,653 (0,421)	0,712 (0,401)	3,23 (0,075)	3,26 (0,074)	5,38 ( <b>0,022</b> )	0,007 (0,936)
<b>D</b>	(CC NIn S/NO) vs (DH ZK C/NO)(DH Ab-V5 C/NO)	0,169 (0,682)	0,986 (0,323)	1,45 (0,232)	1,41 (0,237)	1,35 (0,247)	0,057 (0,812)	2,97 (0,091)
<b>E</b>	(DH NIn S/NO) vs (DH ZK S/NO)(DH Ab-V5 S/NO)	0,453 (0,502)	0,091 (0,763)	0,177 (0,675)	0,91 (0,342)	1,31 (0,256)	2,19 (0,142)	2,55 (0,117)
<b>F</b>	(DH NIn S/NO) vs (DH NIn C/NO)	3,62 (0,06)	2,49 (0,117)	2,87 (0,093)	1,45 (0,231)	1,83 (0,179)	1,27 (0,262)	2 (0,163)
<b>G</b>	(DH NIn S/NO) vs (DH ZK C/NO)(DH Ab-V5 C/NO)	0,116 (0,734)	3,11 (0,081)	2,98 (0,087)	5,19 ( <b>0,025</b> )	6,16 ( <b>0,0146</b> )	1,29 (0,258)	0,00002 (0,997)
<b>H</b>	(DH NIn S/NO) vs (DH ZK S/NO)(DH ZK C/NO)	0,122 (0,727)	0,941 (0,334)	1,18 (0,281)	2,51 (0,116)	2,69 (0,104)	1,77 (0,187)	0,743 (0,393)
<b>I</b>	(DH NIn S/NO) vs (DH Ab-V5 S/NO)(DH Ab-V5 C/NO)	0,0003 (0,987)	1,2 (0,276)	1,13 (0,29)	2,72 (0,102)	3,94 ( <b>0,0497</b> )	1,66 (0,2)	0,544 (0,464)
<b>J</b>	(CC NIn S/NO)(CC ZK S/NO)(CC Ab-V5 S/NO) (DH NIn S/NO)(DH ZK S/NO)(DH Ab-V5 S/NO) vs (CC NIn C/NO)(CC ZK C/NO)(CC Ab-V5 C/NO) (DH NIn C/NO)(DH ZK C/NO)(DH Ab-V5 C/NO)	8,33 ( <b>0,005</b> )	6,18 ( <b>0,014</b> )	7,12 ( <b>0,009</b> )	3,17 (0,078)	3,72 (0,056)	3,11 (0,08)	0,176 (0,677)
<b>K</b>	(CC NIn S/NO)(CC NIn C/NO) (DH NIn S/NO)(DH NIn C/NO) vs (CC ZK S/NO)(CC Ab-V5 S/NO)(CC ZK C/NO) (CC Ab-V5 C/NO)(DH ZK S/NO)(DH Ab-V5 S/NO) (DH ZK C/NO)(DH Ab-V5 C/NO)	1,26 (0,265)	1,53 (0,219)	1,52 (0,221)	3,8 (0,054)	3,18 (0,077)	4,71 ( <b>0,032</b> )	1 (0,322)

**Apêndice 5.** Teste F (valor de P) para contrastes entre tratamentos de mudas de *Cabralea canjerana*. Os contrastes foram ortogonais e previamente estabelecidos. CC: Capacidade de campo; DH: Déficit hídrico; NIn: mudas não inoculadas com bactérias promotoras do crescimento em plantas; ZK: mudas associadas a *Bacillus* sp.; Ab-V5: mudas associadas a *Azospirillum brasilense*; S/NO: mudas em solo sem aplicação de nanopartículas contendo doador de óxido nítrico (NPs de NO); C/NO: mudas em solo com aplicação de NPs de NO. DC: dienos conjugados; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: peróxido de hidrogênio; RSNO: S-nitrosotióis.

Contrastes	DC	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	RSNO
	F (P)		
<b>A</b> (CC NIn S/NO) vs (DH NIn S/NO)	4,41 ( <b>0,041</b> )	0,041 (0,84)	1,92 (0,172)
<b>B</b> (CC NIn S/NO) vs (DH ZK S/NO) (DH Ab-V5 S/NO)	1,37 (0,247)	0,252 (0,618)	5,92 ( <b>0,019</b> )
<b>C</b> (CC NIn S/NO) vs (DH NIn C/NO)	18,7 ( <b>0,00008</b> )	5,23 ( <b>0,027</b> )	4,22 ( <b>0,045</b> )
<b>D</b> (CC NIn S/NO) vs (DH ZK C/NO)(DH Ab-V5 C/NO)	10,3 ( <b>0,0023</b> )	4,63 ( <b>0,036</b> )	0,988 (0,325)
<b>E</b> (DH NIn S/NO) vs (DH ZK S/NO)(DH Ab-V5 S/NO)	12,9 ( <b>0,0008</b> )	0,534 (0,465)	0,691 (0,41)
<b>F</b> (DH NIn S/NO) vs (DH NIn C/NO)	4,93 ( <b>0,031</b> )	4,35 ( <b>0,042</b> )	11,8 ( <b>0,001</b> )
<b>G</b> (DH NIn S/NO) vs (DH ZK C/NO)(DH Ab-V5 C/NO)	31,8 ( <b>0,000001</b> )	3,68 (0,061)	0,369 (0,546)
<b>H</b> (DH NIn S/NO) vs (DH ZK S/NO)(DH ZK C/NO)	23,7 ( <b>0,00001</b> )	2,67 (0,109)	1,48 (0,229)
<b>I</b> (DH NIn S/NO) vs (DH Ab-V5 S/NO)(DH Ab-V5 C/NO)	19,1 ( <b>0,00007</b> )	0,205 (0,653)	2,08 (0,156)
<b>J</b> (CC NIn S/NO)(CC ZK S/NO)(CC Ab-V5 S/NO) (DH NIn S/NO)(DH ZK S/NO)(DH Ab-V5 S/NO) vs (CC NIn C/NO)(CC ZK C/NO)(CC Ab-V5 C/NO) (DH NIn C/NO)(DH ZK C/NO)(DH Ab-V5 C/NO)	4,1 ( <b>0,048</b> )	2,72 (0,105)	3,67 (0,061)
<b>K</b> (CC NIn S/NO)(CC NIn C/NO) (DH NIn S/NO)(DH NIn C/NO) vs (CC ZK S/NO)(CC Ab-V5 S/NO)(CC ZK C/NO) (CC Ab-V5 C/NO)(DH ZK S/NO)(DH Ab-V5 S/NO) (DH ZK C/NO)(DH Ab-V5 C/NO)	79,1 ( <b>0,000000</b> )	0,255 (0,616)	4,41 ( <b>0,041</b> )

**Apêndice 6.** Teste F (valor de P) para contrastes entre tratamentos de mudas de *Cabralea canjerana*. Os contrastes foram ortogonais e previamente estabelecidos. CC: Capacidade de campo; DH: Déficit hídrico; NIn: mudas não inoculadas com bactérias promotoras do crescimento em plantas; ZK: mudas associadas a *Bacillus* sp.; Ab-V5: mudas associadas a *Azospirillum brasilense*; S/NO: mudas em solo sem aplicação de nanopartículas contendo doador de óxido nítrico (NPs de NO); C/NO: mudas em solo com aplicação de NPs de NO. R: massa seca (MS) da raiz; PA: MS parte aérea; R/PA: razão MS raiz/MS PA; P: MS planta; F: MS folhas.

Contrastes		R	PA	R/PA	P	F
		F (P)				
<b>A</b>	(CC NIn S/NO) vs (DH NIn S/NO)	3,75 (0,056)	6,59 ( <b>0,012</b> )	1,83 (0,179)	5,99 ( <b>0,016</b> )	5,37 ( <b>0,022</b> )
<b>B</b>	(CC NIn S/NO) vs (DH ZK S/NO) (DH Ab-V5 S/NO)	12,2 ( <b>0,0007</b> )	16,4 ( <b>0,000098</b> )	3,3 (0,072)	16,6 ( <b>0,00009</b> )	8,3 ( <b>0,005</b> )
<b>C</b>	(CC NIn S/NO) vs (DH NIn C/NO)	3,59 (0,061)	5,36 ( <b>0,023</b> )	0,925 (0,338)	5,19 ( <b>0,025</b> )	7,97 ( <b>0,0057</b> )
<b>D</b>	(CC NIn S/NO) vs (DH ZK C/NO)(DH Ab-V5 C/NO)	7,46 ( <b>0,007</b> )	14,9 ( <b>0,00019</b> )	6,71 ( <b>0,011</b> )	12,9 ( <b>0,0005</b> )	9,72 ( <b>0,0023</b> )
<b>E</b>	(DH NIn S/NO) vs (DH ZK S/NO)(DH Ab-V5 S/NO)	1,59 (0,211)	1,17 (0,281)	0,066 (0,798)	1,55 (0,216)	0,041 (0,839)
<b>F</b>	(DH NIn S/NO) vs (DH NIn C/NO)	0,0016 (0,968)	0,064 (0,801)	0,153 (0,697)	0,029 (0,866)	0,254 (0,615)
<b>G</b>	(DH NIn S/NO) vs (DH ZK C/NO)(DH Ab-V5 C/NO)	0,246 (0,621)	0,812 (0,37)	1,06 (0,305)	0,595 (0,442)	0,194 (0,661)
<b>H</b>	(DH NIn S/NO) vs (DH ZK S/NO)(DH ZK C/NO)	0,049 (0,825)	0,464 (0,497)	0,655 (0,42)	0,26 (0,611)	0,018 (0,895)
<b>I</b>	(DH NIn S/NO) vs (DH Ab-V5 S/NO)(DH Ab-V5 C/NO)	2,35 (0,128)	1,7 (0,195)	0,227 (0,635)	2,27 (0,135)	0,261 (0,611)
<b>J</b>	(CC NIn S/NO)(CC ZK S/NO)(CC Ab-V5 S/NO) (DH NIn S/NO)(DH ZK S/NO)(DH Ab-V5 S/NO) vs (CC NIn C/NO)(CC ZK C/NO)(CC Ab-V5 C/NO) (DH NIn C/NO)(DH ZK C/NO)(DH Ab-V5 C/NO)	0,458 (0,5)	0,479 (0,49)	1,19 (0,277)	0,0077 (0,93)	0,434 (0,512)
<b>K</b>	(CC NIn S/NO)(CC NIn C/NO) (DH NIn S/NO)(DH NIn C/NO) vs (CC ZK S/NO)(CC Ab-V5 S/NO)(CC ZK C/NO) (CC Ab-V5 C/NO)(DH ZK S/NO)(DH Ab-V5 S/NO) (DH ZK C/NO)(DH Ab-V5 C/NO)	0,581 (0,448)	5,46 ( <b>0,021</b> )	3,96 ( <b>0,049</b> )	3,07 (0,083)	1,4 (0,239)

Continuação Apêndice 6. FMF: fração da massa foliar; AF: área foliar total; RAF: razão da área foliar.

Contrastes		FMF	AF	RAF
		F (P)		
<b>A</b>	(CC NIn S/NO) vs (DH NIn S/NO)	1,22 (0,272)	6,01 ( <b>0,016</b> )	1,21 (0,275)
<b>B</b>	(CC NIn S/NO) vs (DH ZK S/NO) (DH Ab-V5 S/NO)	0,21 (0,648)	6,95 ( <b>0,0096</b> )	2,24 (0,138)
<b>C</b>	(CC NIn S/NO) vs (DH NIn C/NO)	5,23 ( <b>0,024</b> )	5,44 ( <b>0,021</b> )	0,411 (0,523)
<b>D</b>	(CC NIn S/NO) vs (DH ZK C/NO)(DH Ab-V5 C/NO)	0,581 (0,448)	7,31 ( <b>0,008</b> )	0,154 (0,695)
<b>E</b>	(DH NIn S/NO) vs (DH ZK S/NO)(DH Ab-V5 S/NO)	3 (0,086)	0,038 (0,846)	7,64 ( <b>0,0067</b> )
<b>F</b>	(DH NIn S/NO) vs (DH NIn C/NO)	1,4 (0,24)	0,014 (0,906)	0,209 (0,649)
<b>G</b>	(DH NIn S/NO) vs (DH ZK C/NO)(DH Ab-V5 C/NO)	0,262 (0,61)	0,016 (0,899)	2,76 (0,1)
<b>H</b>	(DH NIn S/NO) vs (DH ZK S/NO)(DH ZK C/NO)	0,442 (0,508)	0,283 (0,596)	5,01 ( <b>0,027</b> )
<b>I</b>	(DH NIn S/NO) vs (DH Ab-V5 S/NO)(DH Ab-V5 C/NO)	2,49 (0,117)	0,044 (0,834)	4,78 ( <b>0,031</b> )
<b>J</b>	(CC NIn S/NO)(CC ZK S/NO)(CC Ab-V5 S/NO) (DH NIn S/NO)(DH ZK S/NO)(DH Ab-V5 S/NO) vs (CC NIn C/NO)(CC ZK C/NO)(CC Ab-V5 C/NO) (DH NIn C/NO)(DH ZK C/NO)(DH Ab-V5 C/NO)	2,81 (0,097)	0,331 (0,566)	1,7 (0,195)
<b>K</b>	(CC NIn S/NO)(CC NIn C/NO) (DH NIn S/NO)(DH NIn C/NO) vs (CC ZK S/NO)(CC Ab-V5 S/NO)(CC ZK C/NO) (CC Ab-V5 C/NO)(DH ZK S/NO)(DH Ab-V5 S/NO) (DH ZK C/NO)(DH Ab-V5 C/NO)	0,441 (0,508)	0,568 (0,452)	1,98 (0,162)

**Apêndice 7.** Trocas gasosas e conteúdo relativo de água de folhas de mudas de *Heliocarpus popayanensis*. CC: Capacidade de campo; DH: Déficit hídrico; NIn: mudas não inoculadas com bactérias promotoras do crescimento em plantas; ZK: mudas inoculadas com *Bacillus velezensis*; Ab-V5: mudas inoculadas com *Azospirillum brasilense*; S/NO: mudas em solo sem aplicação de nanopartículas com doador de óxido nítrico (NPs de NO); C/NO: mudas em solo com NPs de NO.  $A_{max}$ : assimilação líquida de CO<sub>2</sub> ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ );  $g_s$ : condutância estomática ( $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ );  $E$ : transpiração ( $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ );  $EUA_i$ : eficiência intrínseca no uso da água ( $\mu\text{molCO}_2 \text{ molH}_2\text{O}^{-1}$ );  $C_i/C_a$ : razão concentração intercelular/concentração no ambiente de CO<sub>2</sub>;  $k$ : eficiência instantânea de carboxilação ( $\mu\text{molCO}_2 \text{ m}^{-2} \text{s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$ ). CRA: conteúdo relativo de água (%). Média  $\pm$  erro padrão.

	CC						DH					
	S/NO			C/NO			S/NO			C/NO		
	NIn	ZK	Ab-V5	NIn	ZK	Ab-V5	NIn	ZK	Ab-V5	NIn	ZK	Ab-V5
$A_{max}$	8,43 $\pm$ 1,49	10 $\pm$ 0,64	9,18 $\pm$ 0,594	8,27 $\pm$ 0,682	9,3 $\pm$ 0,427	9,54 $\pm$ 0,73	5,57 $\pm$ 0,966	6,32 $\pm$ 1,11	6,8 $\pm$ 0,939	5,04 $\pm$ 1,4	7,31 $\pm$ 0,432	8,1 $\pm$ 0,551
$g_s$	0,118 $\pm$ 0,017	0,132 $\pm$ 0,015	0,11 $\pm$ 0,014	0,121 $\pm$ 0,013	0,112 $\pm$ 0,01	0,127 $\pm$ 0,018	0,062 $\pm$ 0,012	0,065 $\pm$ 0,02	0,074 $\pm$ 0,013	0,083 $\pm$ 0,011	0,067 $\pm$ 0,006	0,087 $\pm$ 0,007
$E$	1,58 $\pm$ 0,28	1,89 $\pm$ 0,324	1,49 $\pm$ 0,191	1,65 $\pm$ 0,235	1,94 $\pm$ 0,195	2,22 $\pm$ 0,411	0,677 $\pm$ 0,08	0,95 $\pm$ 0,182	1,03 $\pm$ 0,191	1,1 $\pm$ 0,186	1,06 $\pm$ 0,144	1,65 $\pm$ 0,204
$EUA_i$	70,3 $\pm$ 6,29	79,7 $\pm$ 5,43	89 $\pm$ 6,65	71,7 $\pm$ 6,61	87 $\pm$ 6,11	81,3 $\pm$ 6,77	91,7 $\pm$ 7,28	109 $\pm$ 9,35	96,8 $\pm$ 8,21	62,2 $\pm$ 14,6	112 $\pm$ 4,31	95,2 $\pm$ 3,4
$C_i/C_a$	0,687 $\pm$ 0,029	0,644 $\pm$ 0,022	0,616 $\pm$ 0,028	0,683 $\pm$ 0,03	0,612 $\pm$ 0,027	0,634 $\pm$ 0,027	0,621 $\pm$ 0,026	0,535 $\pm$ 0,036	0,589 $\pm$ 0,032	0,729 $\pm$ 0,061	0,527 $\pm$ 0,018	0,581 $\pm$ 0,015
$k$	0,032 $\pm$ 0,006	0,039 $\pm$ 0,002	0,037 $\pm$ 0,002	0,031 $\pm$ 0,003	0,039 $\pm$ 0,002	0,038 $\pm$ 0,003	0,022 $\pm$ 0,004	0,029 $\pm$ 0,004	0,029 $\pm$ 0,004	0,019 $\pm$ 0,006	0,034 $\pm$ 0,002	0,035 $\pm$ 0,002
CRA	92,1 $\pm$ 0,769	92,4 $\pm$ 1,26	90,9 $\pm$ 1,38	90,7 $\pm$ 0,79	90,4 $\pm$ 1,58	89,6 $\pm$ 0,828	80,5 $\pm$ 1,29	82 $\pm$ 2,9	84,7 $\pm$ 2,93	83,6 $\pm$ 4,96	90,1 $\pm$ 1,09	86,7 $\pm$ 0,926

**Apêndice 8.** Parâmetros bioquímicos de folhas de mudas de *Heliocarpus popayanensis*. CC: Capacidade de campo; DH: Déficit hídrico; NIn: mudas não inoculadas com bactérias promotoras do crescimento em plantas; ZK: mudas inoculadas com *Bacillus velezensis*; Ab-V5: mudas inoculadas com *Azospirillum brasilense*; S/NO: mudas em solo sem aplicação de nanopartículas contendo doador de óxido nítrico (NPs de NO); C/NO: mudas em solo com aplicação de NPs de NO. DC: Dienos conjugados ( $\mu\text{mol g}^{-1}$  MS);  $\text{H}_2\text{O}_2$ : peróxido de hidrogênio ( $\mu\text{mol g}^{-1}$  MS); RSNO: S-nitrosotióis ( $\text{nmol g}^{-1}$  MS). Média  $\pm$  erro padrão.

	CC						DH					
	S/NO			C/NO			S/NO			C/NO		
	NIn	ZK	Ab-V5	NIn	ZK	Ab-V5	NIn	ZK	Ab-V5	NIn	ZK	Ab-V5
DC	59,3 $\pm$	33,3 $\pm$	46,7 $\pm$	41,2 $\pm$	34,6 $\pm$	26,8 $\pm$	41,8 $\pm$	42,7 $\pm$	35,2 $\pm$	52,4 $\pm$	28,2 $\pm$	42,2 $\pm$
	0,834	2,26	6,47	8,08	3,47	5,2	6,72	4,02	7,15	3,69	4,3	6,52
$\text{H}_2\text{O}_2$	26,2 $\pm$	27,7 $\pm$	26,3 $\pm$	24,4 $\pm$	30,9 $\pm$	25,8 $\pm$	18,3 $\pm$	28,1 $\pm$	26 $\pm$	28,4 $\pm$	27,3 $\pm$	27,5 $\pm$
	2,1	0,843	1,09	2,31	1,92	1,02	1,64	1,34	2,06	1,41	1,22	1,3
RSNO	40,5 $\pm$	21,2 $\pm$	18,1 $\pm$	12,1 $\pm$	16,5 $\pm$	11,9 $\pm$	10,9 $\pm$	10,6 $\pm$	44,9 $\pm$	27 $\pm$	20,5 $\pm$	43,7 $\pm$
	3,29	2,27	3,26	3,01	1,13	3,91	3,19	2,19	11,4	4,97	3,22	6,88

**Apêndice 9.** Análise biométrica de mudas de *Heliocarpus popayanensis*. CC: Capacidade de Campo; DH: Déficit hídrico; NIn: mudas não inoculadas com bactérias promotoras do crescimento em plantas; ZK: mudas inoculadas com *Bacillus velezensis*; Ab-V5: mudas inoculadas com *Azospirillum brasilense*; S/NO: mudas em solo sem aplicação de nanopartículas com doador de óxido nítrico (NPs de NO); C/NO: mudas em solo com aplicação de NPs de NO. PA: massa seca (MS) parte aérea; R/PA: razão MS raiz/MS PA; P: MS planta; F: MS folhas; FMF: fração da massa foliar; AF: área foliar total (cm<sup>2</sup>); RAF: razão da área foliar (cm<sup>2</sup> g<sup>-1</sup>). Média ± erro padrão.

	CC						DH					
	S/NO			C/NO			S/NO			C/NO		
	NIn	ZK	Ab-V5	NIn	ZK	Ab-V5	NIn	ZK	Ab-V5	NIn	ZK	Ab-V5
<b>PA</b>	0,379 ± 0,07	0,741 ± 0,099	0,579 ± 0,082	0,747 ± 0,064	0,783 ± 0,107	0,672 ± 0,096	0,342 ± 0,017	0,329 ± 0,035	0,341 ± 0,075	0,351 ± 0,055	0,507 ± 0,07	0,398 ± 0,055
<b>R/PA</b>	0,844 ± 0,092	0,734 ± 0,049	0,657 ± 0,1	0,868 ± 0,087	0,71 ± 0,085	0,655 ± 0,027	1,27 ± 0,205	0,908 ± 0,056	1,03 ± 0,098	1,16 ± 0,145	0,903 ± 0,08	1,02 ± 0,126
<b>P</b>	0,703 ± 0,136	1,27 ± 0,168	0,983 ± 0,16	1,42 ± 0,158	1,4 ± 0,235	1,12 ± 0,165	0,779 ± 0,087	0,627 ± 0,069	0,707 ± 0,177	0,767 ± 0,129	0,977 ± 0,154	0,812 ± 0,127
<b>F</b>	0,213 ± 0,038	0,336 ± 0,038	0,309 ± 0,044	0,363 ± 0,029	0,399 ± 0,045	0,378 ± 0,053	0,117 ± 0,018	0,139 ± 0,014	0,137 ± 0,02	0,146 ± 0,029	0,233 ± 0,024	0,196 ± 0,024
<b>FMF</b>	0,317 ± 0,03	0,271 ± 0,017	0,348 ± 0,042	0,276 ± 0,027	0,328 ± 0,035	0,345 ± 0,015	0,157 ± 0,037	0,23 ± 0,024	0,228 ± 0,033	0,21 ± 0,049	0,26 ± 0,031	0,273 ± 0,049
<b>AF</b>	58,9 ± 8,63	87,7 ± 7,94	81 ± 12	97 ± 8,21	103 ± 12,7	97,3 ± 13	35,9 ± 5,52	37,5 ± 4,59	33,5 ± 6,3	42,6 ± 9,2	56,1 ± 6,13	50,1 ± 5,75
<b>RAF</b>	90,1 ± 8,52	72,2 ± 4,63	91,6 ± 11,4	72,1 ± 5,63	83,3 ± 8,27	90,1 ± 5,53	48,6 ± 11,3	61,7 ± 7,2	58,9 ± 10,4	61 ± 14	64,1 ± 9,65	73,5 ± 16,4

**Apêndice 10.** Trocas gasosas e conteúdo relativo de água folíolos de mudas de *Cabralea canjerana*. CC: Capacidade de campo; DH: Déficit hídrico; NIn: mudas não inoculadas com bactérias promotoras do crescimento em plantas; ZK: mudas inoculadas com *Bacillus velezensis*; Ab-V5: mudas inoculadas com *Azospirillum brasilense*; S/NO: mudas em solo sem aplicação de nanopartículas com doador de óxido nítrico (NPs de NO); C/NO: mudas em solo com NPs de NO.  $A_{max}$ : assimilação líquida de  $\text{CO}_2$  ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ );  $g_s$ : condutância estomática ( $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ );  $E$ : transpiração ( $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ );  $EUA_i$ : eficiência intrínseca no uso da água ( $\mu\text{molCO}_2 \text{ molH}_2\text{O}^{-1}$ );  $C_i/C_a$ : razão concentração intercelular/concentração no ambiente de  $\text{CO}_2$ ;  $k$ : eficiência instantânea de carboxilação ( $\mu\text{molCO}_2 \text{ m}^{-2} \text{s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$ ). CRA: conteúdo relativo de água (%). Média  $\pm$  erro padrão.

	CC						DH					
	S/NO			C/NO			S/NO			C/NO		
	NIn	ZK	Ab-V5	NIn	ZK	Ab-V5	NIn	ZK	Ab-V5	NIn	ZK	Ab-V5
$A_{max}$	6,26 $\pm$ 0,558	7,65 $\pm$ 0,343	6,97 $\pm$ 0,602	8,35 $\pm$ 0,42	7,69 $\pm$ 0,531	7,26 $\pm$ 0,305	5,79 $\pm$ 0,632	4,88 $\pm$ 0,637	5,89 $\pm$ 0,503	7,15 $\pm$ 0,561	6,28 $\pm$ 0,451	5,72 $\pm$ 0,331
$g_s$	0,137 $\pm$ 0,023	0,199 $\pm$ 0,027	0,17 $\pm$ 0,027	0,173 $\pm$ 0,019	0,208 $\pm$ 0,029	0,18 $\pm$ 0,02	0,073 $\pm$ 0,015	0,083 $\pm$ 0,019	0,075 $\pm$ 0,011	0,113 $\pm$ 0,021	0,11 $\pm$ 0,022	0,115 $\pm$ 0,021
$E$	2,15 $\pm$ 0,345	2,97 $\pm$ 0,303	2,5 $\pm$ 0,303	2,77 $\pm$ 0,186	3,01 $\pm$ 0,285	2,77 $\pm$ 0,199	1,23 $\pm$ 0,192	1,38 $\pm$ 0,256	1,34 $\pm$ 0,159	1,84 $\pm$ 0,254	1,76 $\pm$ 0,259	1,78 $\pm$ 0,264
$EUA_i$	55 $\pm$ 7,65	45,1 $\pm$ 5,66	55,3 $\pm$ 11,5	52 $\pm$ 4,34	43,4 $\pm$ 5,89	43,9 $\pm$ 4,22	94,8 $\pm$ 10,1	79,7 $\pm$ 13,2	84,9 $\pm$ 6,79	76,9 $\pm$ 9,68	75,1 $\pm$ 11,3	61,2 $\pm$ 7,39
$C_i/C_a$	0,756 $\pm$ 0,029	0,792 $\pm$ 0,022	0,734 $\pm$ 0,044	0,761 $\pm$ 0,018	0,797 $\pm$ 0,024	0,796 $\pm$ 0,018	0,607 $\pm$ 0,038	0,667 $\pm$ 0,049	0,644 $\pm$ 0,025	0,673 $\pm$ 0,036	0,68 $\pm$ 0,043	0,737 $\pm$ 0,028
$k$	0,02 $\pm$ 0,002	0,024 $\pm$ 0,001	0,023 $\pm$ 0,002	0,027 $\pm$ 0,002	0,024 $\pm$ 0,002	0,022 $\pm$ 0,001	0,023 $\pm$ 0,002	0,018 $\pm$ 0,002	0,022 $\pm$ 0,002	0,026 $\pm$ 0,002	0,023 $\pm$ 0,002	0,019 $\pm$ 0,001
CRA	89,2 $\pm$ 1,08	90,5 $\pm$ 0,484	92 $\pm$ 1,06	89,6 $\pm$ 1,39	90,7 $\pm$ 1,3	91,6 $\pm$ 1,26	85,2 $\pm$ 3,98	88,8 $\pm$ 1,12	89,1 $\pm$ 0,774	88,9 $\pm$ 1,69	86,2 $\pm$ 1,21	85,4 $\pm$ 1,44

**Apêndice 11.** Parâmetros bioquímicos de folíolos de mudas de *Cabralea canjerana*. CC: Capacidade de campo; DH: Déficit hídrico; NIn: mudas não inoculadas com bactérias promotoras do crescimento em plantas; ZK: mudas inoculadas com *Bacillus velezensis*; Ab-V5: mudas inoculadas com *Azospirillum brasilense*; S/NO: mudas em solo sem aplicação de nanopartículas contendo doador de óxido nítrico (NPs de NO); C/NO: mudas em solo com aplicação de NPs de NO. DC: Dienos conjugados ( $\mu\text{mol g}^{-1}$  MS);  $\text{H}_2\text{O}_2$ : peróxido de hidrogênio ( $\mu\text{mol g}^{-1}$  MS); RSNO: S-nitrosotióis ( $\text{nmol g}^{-1}$  MS). Média  $\pm$  erro padrão.

	CC						DH					
	S/NO			C/NO			S/NO			C/NO		
	NIn	ZK	Ab-V5	NIn	ZK	Ab-V5	NIn	ZK	Ab-V5	NIn	ZK	Ab-V5
<b>DC</b>	26,1 $\pm$ 1,95	18,4 $\pm$ 1,63	26,2 $\pm$ 1,68	30,3 $\pm$ 2,54	14,6 $\pm$ 3,7	10,9 $\pm$ 2,92	34,8 $\pm$ 2,29	19,1 $\pm$ 2,39	24,8 $\pm$ 2,7	44 $\pm$ 3,93	15,7 $\pm$ 3,65	13,6 $\pm$ 4,14
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	12,8 $\pm$ 0,637	15,1 $\pm$ 0,715	12,5 $\pm$ 1,1	10,5 $\pm$ 0,933	15,3 $\pm$ 2,02	10,8 $\pm$ 0,586	13,3 $\pm$ 0,994	13,5 $\pm$ 1,52	11,2 $\pm$ 1,15	17,6 $\pm$ 1,1	20,8 $\pm$ 4,39	14,2 $\pm$ 0,473
<b>RSNO</b>	25,4 $\pm$ 4,03	20,9 $\pm$ 1,92	16,7 $\pm$ 1,52	15,6 $\pm$ 1,13	52,1 $\pm$ 12	9,67 $\pm$ 1,74	18,7 $\pm$ 1,7	15,5 $\pm$ 1,14	17 $\pm$ 2,07	36,3 $\pm$ 1,67	34,8 $\pm$ 5,18	13,1 $\pm$ 2,26

**Apêndice 12.** Parâmetros biométricos de mudas de *Cabralea canjerana*. CC: Capacidade de campo; DH: Déficit hídrico; NIn: mudas não inoculadas com bactérias promotoras do crescimento em plantas; ZK: mudas associadas a *Bacillus velezensis*; Ab-V5: mudas associadas a *Azospirillum brasilense*; S/NO: mudas em solo sem aplicação de nanopartículas contendo doador de óxido nítrico (NPs de NO); C/NO: mudas em solo com NPs de NO. R: massa seca da raiz (g); PA: massa seca da parte aérea (g); R/PA: razão da massa da raiz pela PA; P: massa seca da planta (g); F: massa seca das folhas (g); FMF: fração da massa foliar; AF: área foliar total (cm<sup>2</sup>); RAF: razão da área foliar (cm<sup>2</sup> g<sup>-1</sup>). Média ± erro padrão.

	CC						DH					
	S/NO			C/NO			S/NO			C/NO		
	NIn	ZK	Ab-V5	NIn	ZK	Ab-V5	NIn	ZK	Ab-V5	NIn	ZK	Ab-V5
<b>R</b>	1,02 ± 0,072	1,07 ± 0,063	1,09 ± 0,072	0,99 ± 0,059	0,997 ± 0,09	0,909 ± 0,049	0,838 ± 0,052	0,68 ± 0,092	0,79 ± 0,055	0,842 ± 0,071	0,959 ± 0,044	0,635 ± 0,062
<b>PA</b>	1,14 ± 0,087	1,01 ± 0,066	1,21 ± 0,09	1,3 ± 0,136	1,11 ± 0,113	1,07 ± 0,067	0,839 ± 0,069	0,587 ± 0,078	0,871 ± 0,061	0,869 ± 0,081	0,953 ± 0,021	0,543 ± 0,072
<b>R/PA</b>	0,916 ± 0,056	1,08 ± 0,067	0,918 ± 0,043	0,814 ± 0,072	0,92 ± 0,044	0,861 ± 0,035	1,04 ± 0,088	1,21 ± 0,109	0,927 ± 0,059	1 ± 0,069	1,01 ± 0,045	1,23 ± 0,069
<b>P</b>	2,16 ± 0,141	2,08 ± 0,12	2,3 ± 0,154	2,29 ± 0,19	2,11 ± 0,199	1,98 ± 0,108	1,68 ± 0,109	1,27 ± 0,162	1,66 ± 0,104	1,71 ± 0,137	1,91 ± 0,055	1,18 ± 0,132
<b>F</b>	0,563 ± 0,049	0,532 ± 0,042	0,604 ± 0,056	0,641 ± 0,073	0,497 ± 0,059	0,515 ± 0,032	0,412 ± 0,04	0,332 ± 0,05	0,468 ± 0,036	0,379 ± 0,033	0,476 ± 0,025	0,297 ± 0,036
<b>FMF</b>	0,261 ± 0,014	0,254 ± 0,009	0,26 ± 0,012	0,274 ± 0,014	0,229 ± 0,014	0,26 ± 0,005	0,242 ± 0,012	0,255 ± 0,017	0,28 ± 0,009	0,222 ± 0,012	0,249 ± 0,009	0,251 ± 0,012
<b>AF</b>	163 ± 15,6	162 ± 11,7	177 ± 12,8	181 ± 18,1	150 ± 17,2	146 ± 10,9	119 ± 11,1	104 ± 13,9	140 ± 8,93	121 ± 9,31	150 ± 7,7	91,3 ± 10,8
<b>RAF</b>	76,2 ± 6,12	78,3 ± 3,2	77,4 ± 3,38	78,6 ± 3,51	69,8 ± 3,72	73,5 ± 2,53	69,9 ± 3,1	83,1 ± 5,76	84,3 ± 1,89	72,5 ± 4,62	79,1 ± 4,41	77,4 ± 4,59

### 3. CONCLUSÃO GERAL

Os resultados obtidos nos dois capítulos da Tese permitem verificar que a inoculação com bactérias associativas e o tratamento com nanopartículas contendo doador de óxido nítrico aumentam a tolerância ao déficit hídrico das espécies arbóreas neotropicais estudadas. Estas técnicas, portanto, se mostram promissoras para aplicação no cultivo de mudas destinadas a sítios de reflorestamento ativo. Os resultados obtidos reforçam a importância de aplicar técnicas já estabelecidas na área agrícola, como a inoculação com bactérias, em outro contexto, como na produção de mudas arbóreas neotropicais. Demonstra também o potencial a ser explorado de técnicas recentes, como a aplicação exógena de óxido nítrico via nanopartículas contendo molécula doadora.

Estes experimentos iniciais de casa de vegetação sugerem que experimentos em campo devem ser executados para verificar a viabilidade das duas técnicas. Diante do cenário preocupante de alterações climáticas, que levam a restrições hídricas, estudos que contribuam para possibilitar o aumento do sucesso de ações envolvendo o reflorestamento são de extrema necessidade.

**ANEXOS**

## ANEXO A

### Normas da revista Environmental and Experimental Botany

#### **Article structure**

1. Manuscripts should be written in English. Authors whose native language is not English are strongly advised to have their manuscripts checked by an English-speaking colleague prior to submission.

#### *Subdivision - numbered sections*

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered

1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this

numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

#### *Introduction*

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

#### *Material and methods*

Provide sufficient details to allow the work to be reproduced by an independent researcher. Methods that are already published should be summarized, and indicated by a reference. If quoting directly from a previously published method, use quotation marks and also cite the source. Any modifications to existing methods should also be described.

#### *Results*

Results should be clear and concise.

#### *Discussion*

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

#### *Conclusions*

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

#### *Appendices*

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

#### **Essential title page information**

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s)

of each author and check that all names are accurately spelled. You can add your name between

parentheses in your own script behind the English transliteration. Present the authors' affiliation

addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lowercase superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.

- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. This responsibility includes answering any future queries about Methodology and Materials. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**

- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

### Highlights

Highlights are mandatory for this journal as they help increase the discoverability of your article via search engines. They consist of a short collection of bullet points that capture the novel results of your research as well as new methods that were used during the study (if any). Please have a look at the examples here: [example Highlights](#).

Highlights should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please

use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point).

### Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the

research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

### Graphical abstract

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. You can view [Example Graphical Abstracts](#) on our information site.

Authors can make use of Elsevier's [Illustration Services](#) to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements.

### Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and

avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

### *Abbreviations*

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

### *Acknowledgements*

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

### *Formatting of funding sources*

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence: This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

### ***Nomenclature and units***

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI.

Authors and Editor(s) are, by general agreement, obliged to accept the rules governing biological

nomenclature, as laid down in the *International Code of Botanical Nomenclature*, the *International Code of Nomenclature of Bacteria*, and the *International Code of Zoological Nomenclature*.

All biotica (crops, plants, insects, birds, mammals, etc.) should be identified by their scientific names when the English term is first used, with the exception of common domestic animals.

All biocides and other organic compounds must be identified by their Geneva names when first used in the text. Active ingredients of all formulations should be likewise identified.

For chemical nomenclature, the conventions of the International Union of Pure and Applied

Chemistry and the official recommendations of the *IUPAC-IUB Combined Commission on Biochemical Nomenclature* should be followed.

### *Math Formulae*

Present simple formulae in the line of normal text where possible. In principle, variables are to be presented in italics.

Number consecutively any equations that have to be displayed separate from the text (if referred to explicitly in the text).

Subscripts and superscripts should be clear.

Greek letters and other non-Roman or handwritten symbols should be explained in the margin where they are first used. Take special care to show clearly the difference between zero (0) and the letter O, and between one (1) and the letter l.

Give the meaning of all symbols immediately after the equation in which they are first used. For

simple fractions use the solidus (/) instead of a horizontal line.

Equations should be numbered serially at the right-hand side in parentheses. In general only equations explicitly referred to in the text need be numbered.

The use of fractional powers instead of root signs is recommended. Also powers of e are often more conveniently denoted by exp.

Levels of statistical significance which can be mentioned without further explanation are: \*P < 0.05, \*\*P < 0.01 and \*\*\*P < 0.001.

In chemical formulae, valence of ions should be given as, e.g., Ca<sup>2+</sup>, not as Ca<sup>++</sup>. Isotope numbers should precede the symbols, e.g., <sup>18</sup>O.

### *Footnotes*

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article.

### *Electronic artwork*

#### *General points*

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Preferred fonts: Arial (or Helvetica), Times New Roman (or Times), Symbol, Courier.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Indicate per figure if it is a single, 1.5 or 2-column fitting image.
- For Word submissions only, you may still provide figures and their captions, and tables within a single file at the revision stage.
- Please note that individual figure files larger than 10 MB must be provided in separate source files.

A detailed [guide on electronic artwork](#) is available.

**You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.**

#### *Formats*

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalized, please 'save as' or

convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'.

TIFF (or JPG): Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPG): Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

#### **Please do not:**

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low.
- Supply files that are too low in resolution.
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

#### *Color artwork*

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. [Further information on the preparation of electronic artwork.](#)

#### *Figure captions*

Ensure that each illustration has a caption. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

#### **Tables**

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells.

#### **References**

##### *Citation in text*

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

##### *Reference links*

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is highly encouraged.

A DOI is guaranteed never to change, so you can use it as a permanent link to any electronic article. An example of a citation using DOI for an article not yet in an issue is: VanDecar J.C., Russo R.M., James D.E., Ambeh W.B., Franke M. (2003). Aseismic continuation of the Lesser Antilles slab beneath northeastern Venezuela. *Journal of Geophysical Research*, <https://doi.org/10.1029/2001JB000884>. Please note the format of such citations should be in the same style as all other references in the paper.

##### *Web references*

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

*Data references*

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

*References in a special issue*

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

*Reference management software*

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support [Citation Style Language styles](#), such as [Mendeley](#). Using citation plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide. If you use reference management software, please ensure that you remove all field codes before submitting the electronic manuscript. [More information on how to remove field codes from different reference management software](#).

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/environmental-and-experimental-botany>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plugins for Microsoft Word or LibreOffice.

*Reference formatting*

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the article number or pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

**Reference**

**Note:** Authors are strongly encouraged to check the accuracy of each reference against its original source.

1. All publications cited in the text should be presented in a list of references following the text of the manuscript. The manuscript should be carefully checked to ensure that the spelling of author's names and dates are exactly the same in the text as in the reference list.
2. In the text refer to the author's name (without initial) and year of publication, followed - if necessary - by a short reference to appropriate pages. Examples: "Since Peterson (1988) has shown that..." "This is in agreement with results obtained later (Kramer,1989, pp. 12-16)".
3. If reference is made in the text to a publication written by more than two authors the name of the first author should be used followed by "et al.". This indication, however,

should never be used in the list of references. In this list names of first author and co-authors should be mentioned.

4. References cited together in the text should be arranged chronologically. The list of references

should be arranged alphabetically on authors' names, and chronologically per author. If an author's name in the list is also mentioned with co-authors the following order should be used: publications of the single author, arranged according to publication dates -- publications of the same author with one co-author -- publications of the author with more than one co-author. Publications by the same author(s) in the same year should be listed as 1994a, 1994b, etc.

5. Use the following system for arranging your references, please note the proper position of the punctuation:

a. *For periodicals* Chettri, M.K., Sawidis, T., Zachariadis, G.A., Stratis, J.A., 1997. Uptake of heavy metals by living and dead *Cladonia* thalli. *Environ. Exp. Bot.* 37, 39-42.

b. *For edited symposia, special issues, etc., published in a periodical* Rice, K., 1992. Theory and conceptual issues. In: Gall, G.A.E., Staton, M. (Eds.), *Integrating Conservation Biology and Agricultural Production. Agriculture, Ecosystems and Environment* 42, 9-26.

c. *For books* Gaugh, Jr., H.G., 1992. *Statistical Analysis of Regional Field Trials*. Elsevier, Amsterdam.

d. *For multi-author books* DeLacy, I.H., Cooper, M., Lawrence, P.K., 1990. Pattern analysis over years of regional variety trials: relationship among sites. In: Kang, M.S. (Ed.), *Genotype by Environment Interaction and Plant Breeding*. Louisiana State University, Baton Rouge, LA, pp. 189-213.

6. Abbreviate the titles of periodicals mentioned in the list of references according to the *Bibliographic Guide for Editors and Authors* (The Chemical Abstracts Service, The Ohio State University, Columbus, OH 43210, USA).

7. In the case of publications in any language other than English, the original title is to be retained. However, the titles of publications in non-Roman alphabets should be transliterated, and a notation such as "(in Russian)" or "(in Greek, with English abstract)" should be added.

8. Work accepted for publication but not yet published should be referred to as "in press".

9. References concerning unpublished data and "personal communications" should not be cited in the reference list but may be mentioned in the text.

#### *Reference style*

*Text:* All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;
3. *Three or more authors:* first author's name followed by 'et al.' and the year of publication.

Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references can be listed either first alphabetically, then chronologically, or vice versa.

Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999)... Or, as demonstrated (Jones, 1999; Allan, 2000)... Kramer et al. (2010) have recently shown ...'

*List:* References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

*Examples:*

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.Sc.2010.00372>.

Reference to a journal publication with an article number:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2018. The art of writing a scientific article. *Heliyon.* 19, e00205. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00205>.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

Reference to a website:

Cancer Research UK, 1975. Cancer statistics reports for the UK. <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/> (accessed 13 March 2003).

Reference to a dataset:

[dataset] Oguro, M., Imahiro, S., Saito, S., Nakashizuka, T., 2015. Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions. *Mendeley Data*, v1. <https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

*Journal abbreviations source*

Abbreviate the titles of periodicals mentioned in the list of references according to the *Bibliographic Guide for Editors and Authors* (The Chemical Abstracts Service, The Ohio State University, Columbus, OH 43210, USA).

**Video**

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the file in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB per file, 1 GB in total. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including [ScienceDirect](#). Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our [video instruction pages](#). Note: since video and animation cannot be embedded in the

print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

### **Data visualization**

Include interactive data visualizations in your publication and let your readers interact and engage more closely with your research. Follow the instructions [here](#) to find out about available data visualization options and how to include them with your article.

### **Supplementary material**

Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material together with the article and supply a concise, descriptive caption for each supplementary file. If you wish to make changes to supplementary material during any stage of the process, please make sure to provide an updated file.

Do not annotate any corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft Office files as these will appear in the published version.

### **Research data**

This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the [research data](#) page.

#### *Data linking*

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system.

For more information, visit the [database linking page](#).

For [supported data repositories](#) a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

#### *Mendeley Data*

This journal supports Mendeley Data, enabling you to deposit any research data (including raw and processed data, video, code, software, algorithms, protocols, and methods) associated with your manuscript in a free-to-use, open access repository.

During the submission process, after uploading your manuscript, you will have the opportunity to upload your relevant datasets directly to *Mendeley Data*. The datasets will be listed and directly accessible to readers next to your published article online. For more information, visit the [Mendeley Data for journals page](#).

#### *Data in Brief*

You have the option of converting any or all parts of your supplementary or additional raw data into one or multiple data articles, a new kind of article that houses and describes your data. Data articles ensure that your data is actively reviewed, curated, formatted, indexed, given a DOI and publicly available to all upon publication. You are encouraged to submit your article for *Data in Brief* as an additional item directly alongside the revised version of your manuscript. If your research article is accepted, your data article will automatically be transferred over to *Data in Brief* where it will be editorially reviewed and published in the open access data journal, *Data in Brief*. Please note an open access fee of 600 USD is payable for publication in *Data in Brief*. Full details can be found on the [Data in Brief website](#). Please use [this template](#) to write your Data in Brief.

#### *MethodsX*

You have the option of converting relevant protocols and methods into one or multiple MethodsX articles, a new kind of article that describes the details of customized research methods. Many researchers spend a significant amount of time on developing methods to fit their specific needs or setting, but often without getting credit for this part of their work. MethodsX, an open access journal, now publishes this information in order to make it searchable, peer reviewed, citable and reproducible.

Authors are encouraged to submit their MethodsX article as an additional item directly alongside the revised version of their manuscript. If your research article is accepted, your methods article will automatically be transferred over to MethodsX where it will be editorially reviewed. Please note an open access fee is payable for publication in MethodsX. Full details can be found on the [MethodsX website](#). Please use [this template](#) to prepare your MethodsX article.

#### *Data statement*

To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission. This may be a requirement of your funding body or institution. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, you will have the opportunity to indicate why during the submission process, for example by stating that the research data is confidential. The statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the [Data Statement page](#).