



**VICTOR NAVARRO DA SILVA**

**PRIMING DE SEMENTES DE *Handroanthus heptaphyllus*  
PARA CULTIVO EM REJEITO DE MINERAÇÃO DE FERRO**

**LAVRAS-MG**

**2021**

VICTOR NAVARRO DA SILVA

*PRIMING* DE SEMENTES DE *Handroanthus heptaphyllus* PARA CULTIVO EM  
REJEITO DE MINERAÇÃO DE FERRO

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fisiologia Vegetal, área de concentração Crescimento e Desenvolvimento de Plantas, para a obtenção do título de Mestre.

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Elisa Monteze Bicalho  
Orientadora

Prof. Dr. Eduardo Gusmão Pereira  
Coorientador

LAVRAS, MG

2021

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

Silva, Victor Navarro da.

*Priming* de sementes de *Handroanthus heptaphyllus* para cultivo em rejeito de mineração de ferro / Victor Navarro da Silva. - 2021.

58 p. : il.

Orientador(a): Elisa Monteze Bicalho.

Coorientador(a): Eduardo Gusmão Pereira.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Lavras, 2021.

Bibliografia.

1. Peróxido de hidrogênio. 2. Óxido Nítrico. 3. Ipê-rosa. I. Bicalho, Elisa Monteze. II. Pereira, Eduardo Gusmão. III. Título.

VICTOR NAVARRO DA SILVA

***PRIMING DE SEMENTES DE *Handroanthus heptaphyllus* PARA CULTIVO EM  
REJEITO DE MINERAÇÃO DE FERRO***

***SEEDS PRIMING OF *Handroanthus heptaphyllus* FOR IRON MINING TAILING  
CULTIVATION***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fisiologia Vegetal, área de concentração Crescimento e Desenvolvimento de Plantas, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 27 de maio de 2021

Dr.<sup>a</sup> Janaina Guenica Silva UFMS

Dr. Advânio Inácio Siqueira Silva UFOPA

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Elisa Monteze Bicalho  
(Orientadora)

Prof. Dr. Eduardo Gusmão Pereira  
(Coorientador)

LAVRAS, MG

2021

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras - UFLA, ao Setor de Fisiologia Vegetal e ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fisiologia Vegetal,

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG).

À minha orientadora, Profa. Elisa Monteze Bicalho, por ter orientado nesse período, por todo o aprendizado, pela paciência, pelos momentos de conselho e ter acreditado em mim.

Ao meu coorientador, Prof. Eduardo Gusmão Pereira, pelo suporte e confiança a mim depositados.

Aos funcionários do Setor de Fisiologia Vegetal, em especial à Salete.

A todos que fazem o LCDP, Aline, Alisson, Ana Maria, Daniela, Fábio, Geovane, Isadora, Josyellem, Maria Isabel, Marina, Rafael. Obrigado pela troca de experiências, vivência, aprendizado e dias de curva de embebição. Em especial, um agradecimento ao Geovane por ter ido à caça das sementes comigo, à Aline, Rafael e Mateus pela amizade e que se tornou um time onde cada um faz de tudo para ajudar os amigos.

Um agradecimento especial à Ludmila pela amizade desde o primeiro dia, pelos ensinamentos, paciência e ajuda na realização das análises bioquímicas.

Aos “guanaxos” a companhia e ajuda de vocês foram essências nessa caminhada, sem vocês seria mais difícil.

Ao Mateus, Ludmila, Thais, Daniela, Rafael e Aline por me aturarem, por escutarem os meus dramas, ouvirem os meus choros, presenciarem os meus surtos e mesmo assim permanecerem ao meu lado servindo como uma rede de suporte pra mim e que com certeza levarei essa amizade para a vida toda.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para o meu crescimento pessoal e profissional e para a realização desse trabalho.

À minha família por todo o apoio, em especial aos meus pais, por todo o amor incondicional e suporte que me deram nessa minha caminhada

À Deus, pelo dom da vida.

Muito agradecido!

## RESUMO

A mineração de ferro é um dos setores mais rentáveis na balança comercial. Entretanto, causa impactos ao remover solo e cobertura vegetal além da contaminação da área por exemplo com Fe, Mn, Cr, Cd, Pb, Zn, Ni e Cu. Devido à degradação por essa atividade, técnicas de reflorestamento com espécies arbóreas nativas, como o *Handroanthus heptaphyllus* (ipê-rosa) são importantes. O *priming* de sementes é um tratamento de pré-semeadura, de baixo custo, usado para melhorar o desempenho da germinação e do estabelecimento de plântulas sob condições ambientais adversas. Moléculas sinalizadoras como *priming*, tais como NO (óxido nítrico) e o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (peróxido de hidrogênio), atuam no crescimento e desenvolvimento das plantas e aliviam a influência negativa do estresse abiótico por metais pesados. Assim, esse trabalho teve como objetivo investigar se sementes tratadas com *priming* em soluções contendo NO e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e a sua combinação apresentariam melhoras na antecipação da germinação e no estabelecimento de plântulas em rejeitos de mineração de ferro, para serem usadas futuramente em técnicas de recuperação. Tratamentos de *priming* foram aplicados em sementes de *H. heptaphyllus* com os condicionantes: H<sub>2</sub>O, 200µM NO, 100µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bem como a combinação 200µM NO+100µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Após a aplicação, as sementes foram cultivadas em latossolo vermelho ou em rejeito de mineradora de ferro proveniente do rompimento da barragem de Brumadinho-MG, Brasil, em 2019. Os resultados mostraram que os tratamentos de *priming* em sementes em ipê-rosa não demonstraram efeito na antecipação da germinação quando comparada com os controles nos dois substratos nem danos oxidativos, tampoco alterações no conteúdo das reservas. Contudo, o tipo de *priming* mostrou efeito nas plântulas de ipê-rosa. O condicionante com NO apresentou maior absorção de Fe e Mn no rejeito, aumentou as atividades das enzimas do sistema antioxidante, ao passo que o condicionante de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> levou a uma menor absorção desses elementos, e ambos condicionantes não apresentaram danos no aparato fotossintético. Pode-se concluir que NO e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induziram diferentes mecanismos de resistência ao Fe e Mn em plântulas de ipê-rosa. Estudos mais aprofundados com essa espécie podem ser usados para diferentes vertentes da aplicação do *priming* com NO podendo vir a servir para técnicas de fitorremediação; e o *priming* com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> podendo ser utilizado para técnicas de reflorestamento em áreas impactadas.

**Palavras chave:** Barragem de rejeito, Ipê-rosa, Óxido nítrico, Peróxido de hidrogênio.

## ABSTRACT

Iron mining is one of the most profitable sectors in the trade balance. However, it causes impacts by removing soil and vegetation cover and contamination of the area, for example, Fe, Mn, Cr, Cd, Pb, Zn, Ni, and Cu. Due to degradation from this activity, reforestation techniques with native tree species, such as *Handroanthus heptaphyllus* (Ipê-rosa) are important. Seed priming is a low-cost pre-sowing treatment used to improve germination and seedling establishment performance under adverse environmental conditions. Signaling molecules such as priming, such as NO (nitric oxide) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (hydrogen peroxide), act on plant growth and development and alleviate the negative influence of abiotic stress by heavy metals. Thus, this work aimed to investigate whether seeds treated with priming in solutions containing NO and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and their combination would improve the anticipation of germination and the establishment of seedlings in iron mining tailings, to be used in future in recovery techniques. Priming treatments were applied to *H. heptaphyllus* seeds with the conditions: H<sub>2</sub>O, 200µM NO, 100µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> as well as the combination 200µM NO+100µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. After application, the seeds were cultivated in red oxisol or tailings from an iron mining company from the rupture of the Brumadinho-MG, Brazil, dam in 2019. The results showed that the priming treatments on seeds in ipe-rosa did not affect anticipating the germination when compared to controls on the two substrates, nor oxidative damage, nor changes in the content of the reserves. However, the type of priming showed an effect on Ipê-rosa seedlings. The NO conditioning showed higher Fe and Mn absorption in the tailings, increased the activities of the enzymes of the antioxidant system, while the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> conditioning led to lower absorption of these elements, and both conditioning agents did not damage the photosynthetic apparatus. It can be concluded that NO and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced different resistance mechanisms to Fe and Mn in Ipê-rosa seedlings. More in-depth studies with this species can be used for different aspects of the application of priming with NO, which could be used for phytoremediation techniques; and priming with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> can be used for reforestation techniques in impacted areas.

**Keywords:** Tailings dam, Nitric oxide, Hydrogen peroxide, Ipê-rosa.

## SUMÁRIO

1.	Introdução .....	10
2.	Referencial teórico .....	12
2.1.	Os impactos negativos da mineração de ferro e os desafios das áreas exploradas .....	12
2.2.	<i>Priming</i> de sementes, plantas nativas e o futuro das técnicas de restauração .....	14
2.3.	O Papel de ROS e RNS na germinação, estabelecimentos de plântulas e em eventos de estresse .....	16
3.	Material e métodos .....	19
3.1.	Material vegetal .....	19
3.2.	Caracterização das sementes para o <i>priming</i> .....	19
3.2.1.	Curva de embebição .....	19
3.2.2.	Curva de secagem .....	20
3.2.3.	Preparo e determinação das concentrações usadas no <i>priming</i> .....	20
3.3.	Obtenção e caracterização do rejeito de mineradora de ferro .....	21
3.4.	Condição dos experimentos .....	22
3.5.	Parâmetros germinativos .....	22
3.5.1.	Germinabilidade .....	23
3.5.2.	T <sub>50</sub> .....	23
3.6.	Termoesbilidade de membrana .....	23
3.7.	Análises bioquímicas .....	24
3.7.1.	Extração de açúcares solúveis totais e aminoácidos .....	24
3.7.2.	Quantificação de prolina .....	25
3.7.3.	Extração e quantificação de proteínas totais .....	25
3.7.4.	Extração e quantificação do peróxido de hidrogênio .....	25
3.7.5.	Extração de enzimas do sistema antioxidante .....	25
3.7.6.	Pigmentos .....	26
3.8.	Fluorescência da clorofila <i>a</i> .....	27
3.9.	Análises de parâmetros de tolerância .....	27
3.10.	Análises de acúmulo de metais .....	28
3.11.	Delineamento experimental e análise estatística .....	28
4.	Resultados .....	28
4.1.	Efeitos do <i>priming</i> na germinação de sementes de <i>H. heptaphyllus</i> .....	28
4.1.1.	Efeitos de doses de <i>priming</i> de NO e H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> na germinação de sementes de <i>H. heptaphyllus</i> em condições controladas .....	28

4.1.2.	Efeitos do <i>priming</i> na germinação de sementes de <i>H. heptaphyllus</i> em solo e rejeito de mineração de ferro.....	29
4.2.	Efeitos do <i>priming</i> no estabelecimento de plântulas de <i>H. heptaphyllus</i> cultivadas em solo e rejeito de mineração de ferro.....	33
5.	Discussão .....	41
6.	Conclusão e perspectivas .....	45
	REFERÊNCIAS .....	46

## 1. Introdução

O crescimento populacional ocasiona um aumento nos processos de industrialização, o que acarreta problemas ambientais de origem antrópica (NICOLÁS et al., 2008; SCIACCA & OLIVERI CONTI, 2009; DESHMUKH et al., 2012). A atividade de mineração de ferro é uma das mais lucrativas decorrentes da industrialização, contudo geram impactos, removendo os solos originais e a cobertura vegetal, como também deixam materiais residuais que contaminam o ar, a água e os solos (SINGH, 2005). Esses resíduos de mineração geralmente liberam metais pesados como o Fe, Mn, Cr, Cd, Pb, Zn, Ni, Cu (VERMA et al., 2012) no solo circundante e contaminam as águas superficiais e subterrâneas (ADHIKARY, 2015). Com a magnitude dos impactos negativos da mineração, o artigo 225 da Constituição da República Federativa do Brasil exige a recuperação de áreas degradadas (RAD) (BRASIL, 1988), no qual recomenda-se o restabelecimento da cobertura vegetal nas áreas degradadas, prática conhecida como revegetação (MOURA, 2015).

O Quadrilátero Ferrífero, estado de Minas Gerais-BR, é uma das principais regiões produtoras de minério de ferro no Brasil, possuindo indústrias em plena atividade em áreas do Cerrado e da Mata Atlântica. Tais domínios são listadas como *hotspots* de biodiversidade mundiais, pois apresentam uma alta taxa de endemismo e um alto percentual de ações antrópicas, o que faz dessas áreas locais de importância para estudos de restauração viável dessa área (MYERS *et al.*, 2000). Diante da necessidade de restauração de áreas degradadas, percebe-se urgência nos estudos com técnicas eficazes, que sejam rápidas, gerem baixos custos e pouco manejo, principalmente, com o uso de espécies arbóreas nativas em áreas originalmente florestais (ANICETO et al., 2021). Entre as técnicas de restauração florestal, a mais utilizada é o plantio de mudas. Contudo, a técnica de semeadura direta, que consiste na introdução direta de sementes no solo do local a ser reflorestado, tem se mostrado eficaz, principalmente, por ser de baixo custo financeiro (Cava et al., 2016; Raupp, et al., 2020; Rodrigues et al., 2020). Nota-se no processo de restauração que a utilização de espécies nativas, como *Handroanthus heptaphyllus* (Vell.) Mattos (ipê-rosa), que ocorrem nesses domínios é de extrema importância na tentativa de restaurar os padrões dos ecossistemas de referência.

A rapidez e uniformidade da germinação são características desejáveis, pois quanto mais tempo as plântulas permanecem nos estágios iniciais de desenvolvimento mais ficam

sujeitas às condições adversas do ambiente (MARTINS *et al.*, 1999). Como as áreas de mineradoras possuem altos níveis de metais pesados presentes do solo, acabam dificultando técnicas de revegetação e reduzindo a taxa de sucesso de estabelecimento das plântulas após a germinação. Altos níveis de metais como o Fe e o Mn podem inibir a mobilização de reservas, ocasionar a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), interrupção da osmorregulação celular, causando também a inibição da germinação e desenvolvimento de plântulas, afetando o processo fotossintético (BARCELO´ e POSCHENRIEDER, 1990; PERFUS-BARBEOCH *et al.*, 2002; BASZYN´SKI, 2014ADREES *et al.*, 2015; KARMOUS *et al.*, 2015). Dessa forma, é imprescindível instaurar técnicas que estimulem a tolerância de sementes e plântulas a esses ambientes e que resulte no aumento do sucesso no processo de restauração.

Em estudos com a aplicação de *priming* com espécies reativas de oxigênio (ROS) e com espécies reativas de nitrogênio (RNS), é possível verificar que a exposição inicial a agentes condicionantes proporciona maior tolerância das plantas a estresses abióticos (BRUCE *et al.*, 2007; WAHID *et al.*, 2007 WANG *et al.*, 2010; HASANUZZAMAN *et al.*, 2011a; MOSTOFA e FUJITA, 2013; MOSTOFA *et al.*, 2014a; SATHIYARAJ *et al.*, 2014; TENG *et al.*, 2014). O peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) possui um papel importante no processo de transdução de sinal associado à tolerância a estresses abióticos e bióticos, e a indução do fenômeno de tolerância cruzada a estresse frequentemente observado em plantas (HOSSAIN *et al.*, 2015). A aplicação exógena de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pode melhorar a germinação, como a antecipação e uniformidade de sementes (FONTAINE *et al.*, 1994; LEUNG, 2019), coordenando o início da germinação de sementes (BARBA-ESPI´N *et al.*, 2011). A aplicação exógena de liberadores de óxido nítrico (NO) resultou em maiores taxas de germinação de sementes e crescimento inicial de plântulas sob várias condições adversas (ZHENG *et al.*, 2011; SINGH *et al.*, 2018; EGBICHI *et al.*, 2014). Dentre os diversos compostos geradores de NO, o nitroprussiato de sódio é um dos mais utilizados em estudos de sinalização de plantas devido à sua eficiência, principalmente em tecidos foliares (EDERLI *et al.*, 2009).

A hipótese de que sementes de *H. heptaphyllus* pré-condicionadas em solução osmótica (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou NO) aceleram o processo germinativo e mitigam efeitos de estresses durante o estabelecimento de plântulas em rejeito de mineração de ferro foi aqui testada. O objetivo foi investigar se as sementes de *H. heptaphyllus*, pré-condicionadas com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e NO e a combinação de ambos poderiam implicar no aumento da porcentagem e velocidade da germinação e estabelecimento de plântulas e quais seriam as alterações bioquímicas decorrentes do cultivo em rejeito de minério de ferro após o *priming*. Espera-se que o *priming*

possa ser usado futuramente em técnicas de restauração em áreas degradadas por atividades de mineração de ferro.

## **2. Referencial teórico**

### **2.1. Os impactos negativos da mineração de ferro e os desafios das áreas exploradas**

O crescimento populacional ocasiona uma intensificação nos processos de industrialização, o que acarreta problemas ambientais (NICOLÁS et al., 2008; SCIACCA e OLIVERI CONTI, 2009; DESHMUKH et al., 2012) gerando os impactos antrópicos. De acordo com Yang *et al.*, (2011), a mineração é uma das indústrias que mais degradam o ambiente a as áreas ao seu entorno. Atividades de mineração alteram drasticamente a superfície natural do solo através de sua remoção e despejo de rejeitos (BANERJEE; GOSWAMI; MUKHERJEE, 2018). Esses resíduos provenientes de mineração de geralmente liberam metais pesados tóxicos no solo circundante e contaminam as águas superficiais e subterrâneas (ADHIKARY, 2015). Os resíduos e entulhos de várias minas contêm aproximadamente 1-50 g kg<sup>-1</sup> de íons de metais pesados, como As, Cd, Cu, Mn, Fe, Pb e Zn, que são tóxicos na natureza (BRADSHAW et al., 1978).

Altas concentrações de metais pesados no solo afetam negativamente o crescimento e o desenvolvimento das plantas, inclusive a germinação, cujo atraso é causado pelo efeito tóxico de íons de metais pesados (WIERZBICKA e OBIDZIŃSKA 1998, IZMAIŁOW et al. 2015). Estudos documentaram que, através da inibição da mobilização de reservas, da formação de espécies reativas de oxigênio e interrupção da osmorregulação celular, os metais pesados causam inibição da germinação e desenvolvimento de plântulas, afetando posteriormente o processo fotossintético (BARCELO´ e POSCHENRIEDER, 1990; PERFUS-BARBEOCH et al., 2002; BASZYN´SKI, 2014ADREES et al., 2015; KARMOUS et al., 2015).

Dentre as principais causas de danos provenientes de metais pesados, observa-se mudanças nos perfis proteicos das plantas e danos no processo fotossintético. As proteínas, importantes reservas e fonte de cadeias carbônicas para a síntese de enzimas durante a germinação das sementes, são drasticamente afetadas em sementes e plântulas que crescem em ambientes contaminados por metais pesados (SENEVIRATNE, et al., 2017). Estudos extensos foram realizados sobre o efeito de As, Cd, Al e Ni na atividades dessa enzimas proteases (MAHESHWARI E DUBEY 2008, 2009; MISHRA E DUBEY 2006; MISHRA et

al. 2011; SHAH E DUBEY 1995, 1998; SHAH et al. 2001), no qual mostraram mudanças nos níveis de proteínas e aminoácidos livres em sementes e plântulas. Os metais pesados são frequentemente descritos como substâncias prejudiciais para a fotossíntese (PRASAD E STRZĄŁKA 1999). Eles interrompem as atividades enzimáticas, oxidam o PSII e desorganizam a cadeia de transporte de elétrons, além disso, causam danos estruturais nos cloroplastos e nas membranas tilacóides (SENEVIRATNE, et al., 2017).

O potencial impacto associado aos rejeitos de mineração de ferro e os contaminantes provenientes é o foco de preocupação tanto da indústria de mineração quanto das agências de legislação ambiental e membros do poder público. Dessa forma, se vê a urgência que as áreas de pós-mineração e os resíduos gerados precisem ser rapidamente revegetados (BANERJEE; GOSWAMI; MUKHERJEE, 2018). Devido à magnitude dos impactos negativos da mineração (MECHI; SANCHES, 2010), o artigo 225 da Constituição Federal exige a Recuperação de Áreas Degradadas (RAD) por mineração por parte do minerador (BRASIL, 1988), devendo este elaborar Plano de Recuperação da Área Degradada (PRAD) ao final da sua fase produtiva (BRASIL, 1989). O documento recomenda a adoção de procedimentos para estabelecer ou restabelecer a cobertura vegetal nas áreas degradadas, prática conhecida como revegetação (MOURA, 2015).

O surgimento de espécies vegetais nativas de maneira espontânea, permitindo uma sucessão vegetal, em ambientes previamente minerados é um processo lento, difícil que acaba sendo quase impossível (MALCOVÁ et al., 2001, SILVA et al., 2006). Por esse motivo se faz necessário o desenvolvimento de técnicas que ofereçam subsídios e facilitem recuperação da área alterada a partir da eliminação ou redução dos impactos gerados (RODRIGUES et al., 2009).

Estudos para a restauração de áreas degradadas, que visam técnicas de reflorestamento eficazes, rápidas, com baixos custos financeiros e de preferência com pouco manejo, principalmente, com espécies arbóreas nativas (ANICETO et al., 2021) são urgentes. O plantio de mudas está entre as técnicas mais utilizadas de recuperação florestal, contudo a técnica de semeadura direta, que consiste na introdução direta de sementes de espécies florestais no solo do local a ser reflorestado, tem se mostrado mais eficaz pois acaba sendo de menor custo e pouco manejo (Cava et al., 2016; Raupp, et al., 2020; Rodrigues et al., 2020).

Nos últimos anos, dois eventos chamaram muita atenção para o setor de mineração de ferro no Brasil, desastres que impactaram a fauna, flora, as comunidades e a economia (AUGUSTO, 2018). Em 05 de novembro de 2015 uma das barragens de contenção da

SAMARCO, a barragem de Fundão, localizada no município de Mariana- MG, Brasil, rompeu e lançou no ambiente cerca de 50 milhões de m<sup>3</sup> de rejeito (IBAMA, 2015), resultando em 19 mortes (AUGUSTO, 2018), esse foi um dos maiores desastres ambientais do setor de mineração do mundo, tanto na questão de volume do resíduo despejado quanto na magnitude do dano (CARMO et al., 2017). Em 25 de janeiro de 2019 ocorreu o rompimento da Barragem I da VALE, no Córrego do Feijão, em Brumadinho-MG, Brasil, resultando no vazamento de 12 milhões m<sup>3</sup> de rejeitos, atingindo 46 km de áreas próximas, totalizando 165 vítimas fatais e 155 pessoas desaparecidas (ARMADA, 2020).

Saber escolher as espécies vegetais é fundamental para programas bem-sucedidos de conservação e recuperação em ambientes degradados por atividades de mineração (SIQUEIRA-SILVA, et al.,2019). Segundo Almeida, Moura e Vieira (2019), espécies arbóreas apresentam inúmeras vantagens num processo de recuperação, quanto à melhoria da qualidade do solo, pois seu extenso sistema radicular permite que as árvores não só acumulem nutrientes que são retirados do solo, mas também efetuem sua redistribuição melhorando a fertilidade dos horizontes subsuperficiais.

A escolha da espécie para a presente proposta levou como fator importante de decisão que ela seja nativa e presente nos domínios Cerrado e Mata Atlântica. Nativa destes dois domínios, *H. heptaphyllus*, mais comumente conhecido como ipê-rosa, pertencente à família Bignoniaceae (REITZ et al., 1983), é uma espécie que tem sido recentemente utilizada na recuperação de áreas degradadas e em relação à contaminação por metais. Estudos mostram que o ipê-rosa é uma espécie tolerante a solos contaminados com Zn, mantendo crescimento mesmo sob altas concentrações do metal (GAI & VIEIRA, 2017). Cruz *et al.* (2020) verificaram que *H. heptaphyllus* consegue germinar e se estabelecer em rejeitos de minério de ferro oriundos do rompimento da barragem de Mariana (MG) e acumular ferro na parte aérea. Dessa forma, o uso de sementes de *H. heptaphyllus* é uma alternativa promissora na recomposição de áreas degradadas.

## **2.2. Priming de sementes, plantas nativas e o futuro das técnicas de restauração**

Segundo Bewley et al. 2013, p.113,

“A germinação começa com a absorção de água pela semente (embebição) e termina com o surgimento do eixo embrionário, geralmente a radícula, através das estruturas que o circundam”.

A absorção inicial da água, Fase I, é principalmente um processo físico; porém, as atividades fisiológicas podem começar em poucos minutos após a hidratação de uma célula,

muito antes de todos os tecidos das sementes serem totalmente hidratados. Durante a Fase II, o conteúdo de água das sementes é estabilizado e as atividades metabólicas aumentam com a transcrição substancial de novos genes. O surgimento da radícula através das estruturas circundantes no final desta fase marca a conclusão da germinação e, na fase III, há mais absorção de água à medida que as plântulas se estabelecem, utilizando as principais reservas armazenadas.

Velocidade e uniformidade de germinação são variáveis requeridas em processos de restauração, pois quanto mais tempo a plântula permanece nos estágios iniciais do seu desenvolvimento, conseqüentemente ficam mais tempo sujeitas às condições adversas do ambiente (MARTINS et al., 1999). O *priming* de sementes é um tratamento de pré-semeadura usado com sucesso para melhorar o desempenho da germinação e o estabelecimento de várias plantas cultivadas em condições ambientais ótimas e adversas (LECHOWSKA et al., 2019).

O processo de *priming* de sementes, ou condicionamento fisiológico de sementes, envolve, primeiro, a exposição a um condicionante, tornando as plantas mais tolerantes à exposição futura ao estresse (BECKERS e CONRATH, 2007; TANOU et al., 2012, BORGES et al., 2014). O *priming* é um procedimento que consiste na hidratação da semente até a fase II, com ou sem um agente condicionante, seguido pela secagem da semente, para que o processo fisiológico da germinação inicie, mas impeça o surgimento da radícula (GIRI E SCHILLINGER, 2003). O *priming* melhora mecanismos de germinação, e o de defesa, que capacita as sementes a superar os estresses ambientais que ocorrem durante a germinação (FAROOQ et al., 2006, 2009). Tais tratamentos resultam em uniformidade aumento da taxa de germinação e emergência de plântulas (KORKMAZ, 2005; SIVRITEPE et al., 2005; FAROOQ et al., 2007; GUPTA et al., 2008; DURSUN e EKINCI, 2010; SHARMA et al., 2014) e pode melhorar o estabelecimento de plântulas sob condições estressantes (MCDONALD, 2000; ASHRAF e FOOLAD, 2005; SOEDA et al., 2005; KHAN et al., 2009a, 2009b; PATADE et al., 2009; FILIPPOU et al., 2012 BEWLEY et al., 2013, HOSSAIN e FUJITA, 2013; MOSTOFA e FUJITA, 2013; BORGES et al., 2014; MOSTOFA et al., 2014a, b, c; NAHAR et al., 2014, WANG et al., 2014).

Há diversos métodos de *priming* de sementes desenvolvidos para melhorar os parâmetros de germinação e o vigor das plântulas, incluindo hidrocondicionamento, osmocondicionamento, bio-condicionamento, preparação de matriz sólida, hormocondicionamento e outros (LUTTS et al., 2016). O osmocondicionamento (*osmopriming*) é uma técnica na qual a hidratação das sementes durante a fase de imersão é

restrita ao nível desejado pela aplicação de uma solução com baixo potencial osmótico (WOJTYLA et al., 2016). Trabalhos sugerem que a exposição inicial a agentes primários químicos (como  $H_2O_2$  e NO), torna as plantas mais tolerantes a estresses abióticos (BRUCE et al., 2007; WAHID et al., 2007, WANG et al., 2010a; HASANUZZAMAN et al., 2011a; MOSTOFA e FUJITA, 2013; MOSTOFA et al., 2014a; SATHIYARAJ et al., 2014; TENG et al., 2014).

O *priming* resulta em sucesso no estímulo à germinação de espécies arbóreas nativas pioneiras em florestas tropicais (RODRIGUES et al. 2009); o *priming* melhorou o estabelecimento de plântulas de uma espécie de árvore pioneira *Guazuma ulmifolia*, árvore nativa do Brasil (BRANCALION et al., 2010), também induziu a germinação antecipada de várias espécies arbóreas (*Albizia saman*, *Cedrela odorata*, *Enterolobium cyclocarpum* e *Swietenia macrophylla*) nativas da floresta tropical semidecídua de Veracruz, México (PERAZA-VILLARREAL et al., 2018). A técnica de *priming* de sementes nativas auxilia nos métodos semeadura direta para a recuperação de impactadas negativamente (PEDRINI et al., 2020). Dessa forma, é de se esperar que em solos contaminados por metais pesados, o *priming* de sementes melhore a germinação ao estimular as atividades metabólicas da semente, desenvolvendo raízes robustas em plântulas sob condições de estresse por zinco (SHETEIWY et al. 2016). Em solos contaminados por cádmio, já foi relatado que o *priming* de sementes com moléculas sinalizadoras antecipam a germinação (LU et al., 2018).

### **2.3. O Papel de ROS e RNS na germinação, estabelecimentos de plântulas e em eventos de estresse**

Em sementes durante a embebição, as espécies reativas de oxigênio (ROS) podem ser geradas a partir de todos os compartimentos metabolicamente ativos, como nas mitocôndrias (por atividade respiratória) e NADPH oxidase localizadas na membrana plasmática (BAILLY, 2004). Em sementes hidratadas, a continuação do aumento da atividade respiratória ao longo da embebição pode levar ao aumento da produção de ROS (RHOADS et al., 2006; EL-MAAROUF-BOUTEAU e BAILLY, 2008).

De acordo com Bailly *et al.* (2008), as sementes respondem diferentemente às ROS dentro de uma “janela oxidativa”, que, em concentrações controladas, promove a germinação das sementes. Níveis de ROS acima ou abaixo desta “janela oxidativa” podem danificar as

células ou podem não ser suficientes para ativar as vias metabólicas relevantes do processo de germinação.

Nas plantas, a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) é um resultado da oxidação do oxigênio molecular em decorrência de reações metabólicas que ocorrem em vários locais dentro de uma célula vegetal. Além do peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), o ânion superóxido ( $O\cdot^{-2}$ ), o radical hidroxila ( $OH\cdot$ ) e o oxigênio singleto ( $^1O\cdot_2$ ) também são produzidos como uma das primeiras respostas de células vegetais a estresses ambientais, que em concentrações fora do controle homeostático celular, podem causar danos a uma variedade de processos biológicos (HALLIWELL, 2006; GILL e TUTEJA, 2010; DAS E ROYCHOUDHURY, 2014). Em plantas sujeitas a estresses abióticos, como salinidade, seca, frio, calor e metais pesados, os níveis de ROS podem aumentar significativamente, levando a desequilíbrio redox e estresse oxidativo (HOSSAIN et al., 2010; HASANUZZAMAN et al., 2011a, b; HOSSAIN e FUJITA, 2013; MOSTOFA e FUJITA, 2013; DAS e ROYCHOUDHURY, 2014; MOSTOFA et al., 2014a, b, c; NAHAR et al., 2014). Níveis elevados de ROS podem causar danos intensos às proteínas, ao DNA e aos lipídios, afetando as funções celulares normais, o que pode levar à disfunção metabólica permanente e conseqüentemente à morte de plantas (ANJUM et al., 2015).

Em níveis de homeostase redox, ROS desempenham um significativo papel na sinalização para regular a ampla variedade de processos vegetais, incluindo alongamento, diferenciação, morfogênese celular e respostas ao estresse ambiental (DAT et al., 2000; FOREMAN et al., 2003; TSUKAGOSHI et al., 2010; BHATTACHARJEE, 2012). Estudos demonstraram que o  $H_2O_2$  possui um papel importante no processo de transdução de sinal associado à tolerância a estresses abióticos e bióticos, e à indução do fenômeno de tolerância cruzada a estresse frequentemente observado em plantas (HOSSAIN et al., 2015).

As espécies reativas de nitrogênio (RNS) são geradas quando o óxido nítrico (NO) produzido tanto de maneira exógena ou endógena, interagem com espécies reativas de oxigênio (AUGER et al., 2011). As RNS como o NO estão envolvidos em muitos processos fisiológicos primários, incluindo germinação de sementes, crescimento e desenvolvimento radicular, controle dos movimentos estomáticos, floração, regulação do crescimento do tubo polínico, amadurecimento de frutos e senescência (DOMINGOS et al., 2015; SAMI et al., 2018). O NO também desempenha um papel crítico no desencadeamento dos mecanismos de defesa das plantas na resposta aos estresses abióticos, como salinidade, seca, alta e baixa

temperatura e metais pesados (CORPAS et al., 2011; GUPTA et al., 2011; SAHAY e GUPTA 2017; SAMI et al., 2018).

Conforme descrito, tem-se que as moléculas de sinalização de NO e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> possuem funções variadas na regulação de diversos processos fisiológicos em plantas (LINDERMAYR, 2018). Estudos recentes mostram que o NO e o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> interagem para aliviar a influência negativa do estresse abiótico no crescimento, metabolismo e desenvolvimento das plantas. Assim, ambos NO e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> são gerados nas células vegetais para ativar diferentes mecanismos de resistência (Gupta *et al.* 2019).

A germinação das sementes e o crescimento inicial das plântulas são dois estágios importantes do desenvolvimento das plantas (AZEREDO et al., 2016) muito sensíveis à presença de metais pesados, que interferem negativamente nesses estágios (SENEVIRATNE, et al., 2017). O trabalho realizado por Cruz *et al.*, (2020) com espécies nativas mostrou que o rejeito de minério de ferro da barragem de Fundão (MG) interferiu no crescimento de espécies vegetais nativas da Mata Atlântica, mas não na sua germinação, relatando que elas podem ser utilizadas para revegetar essa área. Mas novas pesquisas devem ser feitas para investigar a utilização de sementes pré-condicionadas para melhorar a germinação e o estabelecimento de plântulas de espécies nativas para revegetar as áreas degradadas pela atividade de mineração de ferro.

Pesquisas têm mostrado que a aplicação exógena de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pode induzir tolerância à salinidade, seca, frio, e altas temperaturas, a altos níveis de metais pesados (GONG et al., 2001; UCHIDA et al., 2002; AZEVEDO-NETO et al., 2005; CHAO et al., 2009; LIU et al., 2010; WANG et al., 2010, 2014; ISHIBASHI et al., 2011; GONDIM et al., 2012, 2013; HOSSAIN e FUJITA, 2013), melhorando a germinação de sementes de muitas espécies de plantas (FONTAINE et al., 1994; ZEINALABEDINI et al., 2009; LEUNG, 2019). Já foi relatado que o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> coordena o início da germinação de sementes, atuando como um fator primordial que envolve alterações específicas resultando na aceleração do processo de germinação, provavelmente devido ao fortalecimento das sementes (BARBA-ESPÍN et al., 2011).

Dentre os diversos compostos geradores de NO, o nitroprussiato de sódio é um dos mais utilizados em estudos de sinalização de plantas devido à sua eficiência, principalmente em tecidos foliares (EDERLI et al., 2009). O uso de doadores de NO resulta em altas taxas de germinação de sementes e crescimento inicial de plântulas sob ambientes com estresses bióticos e abióticos (ZHENG et al., 2011; SINGH *et al.*, 2018; EGBICHI et al., 2014).

Estudos mostraram a interação e sinalização entre espécies reativas de nitrogênio, como NO, com outros reguladores do crescimento, ocorrendo antes da conclusão da germinação de sementes (NONOGAKI 2014, 2017).

Dessa forma, o *priming* de sementes torna-se uma alternativa viável para ser inserida como tecnologia auxiliar na revegetação de áreas degradadas, pois trata-se de uma técnica fácil, de baixo custo e risco, há tempos já usada para superar o problema de estresse abiótico (MAITI e PRAMANIK, 2013). Assim, é urgente que estudos possam viabilizar o uso da técnica para a restauração de áreas afetadas pela atividade mineradora de ferro.

### **3. Material e métodos**

#### **3.1. Material vegetal**

As sementes de *Handroanthus heptaphyllus* (Vell.) Mattos, popularmente conhecido como ipê-rosa, pertencente à família Bignoniaceae (REITZ et al., 1983), foram coletadas no *campus* da Universidade Federal de Lavras (UFLA)- Lavras-MG, Brasil, com coordenadas geográficas de referência são 21°17'33" S de latitude, 45°10'41" W de longitude e 904 m de altitude, com pelo menos 10 indivíduos da população, cujas matrizes estão cultivadas em latossolo vermelho. As sementes foram beneficiadas, armazenadas em sacos de papel kraft e colocadas no refrigerador até o início dos testes e experimentos.

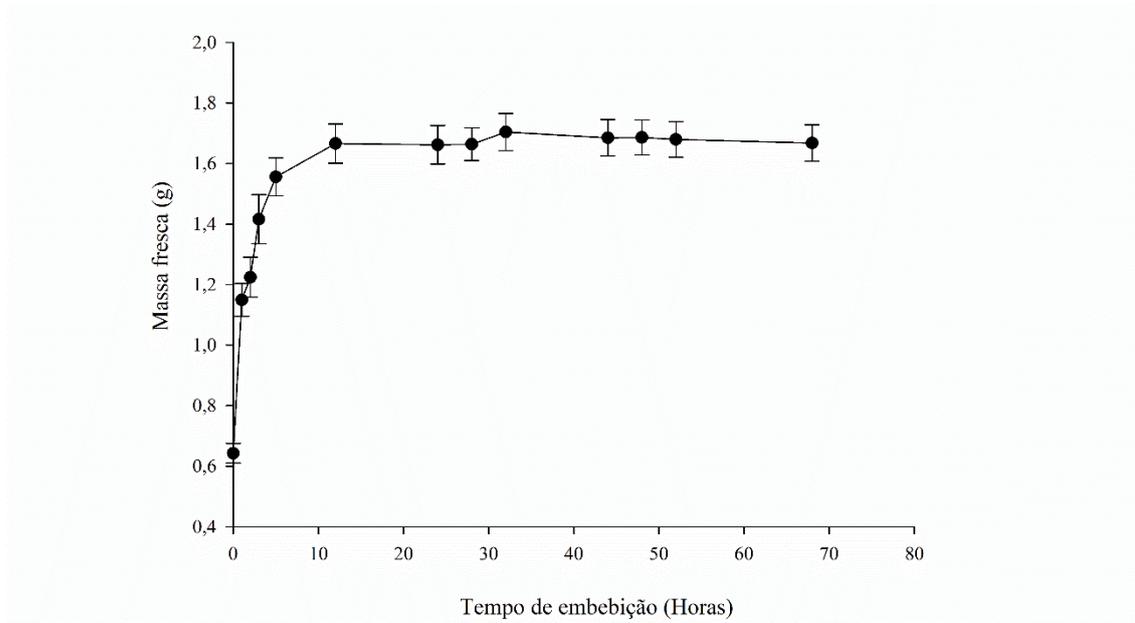
#### **3.2. Caracterização das sementes para o *priming***

##### **3.2.1. Curva de embebição**

As sementes *H. heptaphyllus* foram desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio (NaClO) 1,0% com duas gotas de Tween 20 (detergente) por 10 minutos e lavadas três vezes em água deionizada. A massa fresca foi aferida por meio de balança analítica utilizando 4 repetições de 25 sementes e foi considerado o peso de cada repetição na obtenção dos valores. Após a desinfestação e a obtenção da massa inicial, as sementes foram colocadas em placas de Petri sobre papel filtro umedecido com água deionizada. As placas foram mantidas à temperatura ambiente ( $25 \pm 2^\circ \text{C}$ ) e a cada uma hora durante 12 horas e logo depois foram realizadas pesagens de 24h em 24h foi realizada a obtenção da massa fresca das sementes. A curva de embebição das sementes foi construída com os valores de massa fresca ao longo do tempo. O tempo obtido para estabilização do peso marcou o final da fase II da embebição

(Fig.1) e foi utilizado na aplicação dos tratamentos. Assim, foi determinado o tempo de 45h para que as sementes de *H. heptaphyllus* atingissem a fase II.

Figura 1- Curva de embebição de sementes de *Handroanthus heptaphyllus*.



Fonte: Do Autor (2021).

### 3.2.2. Curva de secagem

Ao atingirem o tempo de embebição de 45h, as sementes foram colocadas para secar para retornarem a massa inicial. As sementes foram mantidas em estufa à temperatura de 28°C e as massas foram aferidas por meio de pesagens a cada 1h nas primeiras 12h, e logo depois foram realizadas pesagens de 2h em 2h para determinar quanto tempo as sementes tardaram a retornar à massa inicial. Foi assim determinado o tempo de 20h em estufa à temperatura de 28°C para a secagem das sementes de *H. heptaphyllus* até a massa inicial.

### 3.2.3. Preparo e determinação das concentrações usadas no priming

Foi feita uma curva de dose e resposta germinativa para determinar as concentrações de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e óxido nítrico (NO) para aplicação do *priming*. Foi utilizado o Nitroprussiato de sódio como doador de NO. As concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> utilizadas foram: 100, 200, 300 400 e 500 µM (Hemalatha et. al, 2017), e para o NO as concentrações foram: 50, 100, 150, 200 e 250 µM. (GAVASSI et al., 2019). Após a embebição nestas soluções e posterior secagem, conforme mencionado, as sementes, logo em seguida, foram colocadas para germinar.

Em caixas tipo Gerbox transparentes foram colocados 150g de substrato vermiculita, onde foram semeadas sementes pré-condicionadas nas concentrações citadas com 25 sementes, com 4 repetições para cada concentração dos condicionantes. As sementes foram colocadas para germinar em câmara de germinação com fotoperíodo, sendo a temperatura ótima de germinação 30°C e fotoperíodo 12 horas e 40  $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  (CRUZ et al., 2020). Foi feito o acompanhamento da germinação ao longo de 7 dias, no qual foi possível determinar a concentração mais eficiente de NO e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para promoção da germinação (Fig. 2). De acordo com os valores do índice de velocidade de germinação (IVG), foram então determinadas as concentrações de 200 $\mu\text{M}$  NO e 100 $\mu\text{M}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para sementes de *H. heptaphyllus* para serem cultivadas em solo ou rejeito.

### 3.3. Obtenção e caracterização do rejeito de mineradora de ferro

O rejeito de mineração utilizado nos experimentos foi coletado na Mina do Pico, pertencente a empresa VALE S.A., no município de Itabirito- MG, Brasil, em abril de 2019.

O rejeito de mineração de ferro foi encaminhado ao Laboratório de Análise de Solo, Tecidos vegetais e Fertilizante (UFV- Viçosa) e o latossolo utilizado nos experimentos proveniente dessa área de transição Cerrado e Mata Atlântica foi encaminhado ao Laboratório de análise de Solos (UFLA) para as análises de composição química de ambos os substratos, pelo método de espectrometria de absorção atômica, pelo extrator Mehlich<sup>-1</sup>, da qual foram obtidas as seguintes concentrações de macronutrientes, micronutrientes e metais pesados (Tabela 1).

Tabela 1- Análises químicas dos substratos ( $\text{mg dm}^{-3}$ ) latossolo e rejeito de mineração de ferro

Componentes químicos	Latossolo	Rejeito de Mineradora de ferro
<b>P (<math>\text{mg dm}^{-3}</math>)</b>	0,05	8,3
<b>Mg (<math>\text{mg dm}^{-3}</math>)</b>	0,20	0,01
<b>Ca (<math>\text{mg dm}^{-3}</math>)</b>	0,60	0,31
<b>Mn (<math>\text{mg dm}^{-3}</math>)</b>	12,0	26,0
<b>Fe (<math>\text{mg dm}^{-3}</math>)</b>	61,20	33,1
<b>Zn(<math>\text{mg dm}^{-3}</math>)</b>	0,60	0,64
<b>Cu (<math>\text{mg dm}^{-3}</math>)</b>	1,09	0,45
<b>Cd (<math>\text{mg dm}^{-3}</math>)</b>	-	0,23
<b>Pb (<math>\text{mg dm}^{-3}</math>)</b>	-	1,13

<b>pH</b>	6,4	5,48
-----------	-----	------

Fonte: Do Autor (2021).

### 3.4. Condição dos experimentos

No experimento 1, foi avaliada a germinação de sementes de *H. heptaphyllus* em solo ou rejeito de mineração. No experimento 2, foi avaliado o estabelecimento de plântulas de *H. heptaphyllus* em solo ou rejeito de mineração. Em ambos os experimentos o latossolo vermelho foi misturado em uma proporção 2:1 de areia, sendo uma proporção de 2 de latossolo vermelho e 1 de areia, e o rejeito de mineração de ferro na proporção 1:1 de areia. Em ambos, as sementes foram provenientes ou não dos tratamentos de *priming* com H<sub>2</sub>O, 200µM NO e 100µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e da combinação de ambos.

Os experimentos foram conduzidos em paralelo, em casa de vegetação no *campus* da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras – MG, Brasil, coordenadas geográficas de referência são 21°17'33" S de latitude, 45°10'41" W de longitude e 904 m de altitude. No experimento 1, foram semeadas 35 sementes de *H. heptaphyllus* em vasos de 0,8L com os respectivos substratos (solo e rejeito), com os seguintes tratamentos: 1) Controle (sementes não tratadas); 2) *priming* com H<sub>2</sub>O; 3) *priming* com 200µM NO; 4) *priming* com 100µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e 5) *priming* com 200µM NO+100µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Foram utilizadas 5 repetições de cada tratamento para cada tipo de substrato, totalizando 50 unidades amostrais.

As sementes foram acompanhadas por 10 dias, que foi o período de estabilização da germinação (dois dias sem aumento da porcentagem de germinação nas repetições). Neste período foram avaliados os parâmetros germinativos. As sementes foram também coletadas para análises bioquímicas (tópico 3.7)

No experimento 2, dez plântulas em cada repetição cultivadas em vasos nas mesmas condições descritas para as sementes. Foram analisadas quanto ao crescimento, fluorescência da clorofila *a* e ensaios bioquímicos (tópico 3.7) aos 50 dias de cultivo, onde o controle já estavam com o segundo par de folhas emergidos.

### 3.5. Parâmetros germinativos

### 3.5.1. Germinabilidade

As sementes foram avaliadas diariamente para verificação da porcentagem de germinação (germinação acumulada), cujo critério adotado foi a protrusão da radícula (> 2mm). O Índice de Velocidade de Germinação (IVG) foi calculado segundo Maguire (1962), onde  $G$  = número de sementes germinadas, e  $N$  = dias da instalação do teste.

$$IVG = \sum \frac{G1}{N1} + \frac{G2}{N2} \dots \dots \cdot \frac{Gn}{Nn'}$$

### 3.5.2. T<sub>50</sub>

O T<sub>50</sub> corresponde ao tempo necessário para que 50% do lote de sementes germine, de acordo com a fórmula abaixo, em que:  $N$  o número total de sementes germinadas;  $n_i$  e  $n_j$ , o número de sementes de acordo com:  $n_i < N/2 < n_j$ ; e  $t_i$  e  $t_j$  são os dias em que  $n_i$  e  $n_j$  ocorreram, segundo Farooq *et al.*, (2005).

$$T_{50} = t_i + \frac{(\frac{N}{2} - n_i)(t_i - t_j)}{(n_j - n_i)}$$

### 3.6. Termoesbilidade de membrana

A determinação da termoestabilidade de membranas das sementes de *H. heptaphyllus* foi medida usando condutivímetro. Em frascos contendo 10 ml de água deionizada, dez sementes por repetição foram mantidas a 25 °C por 4 h para leitura utilizando condutivímetro. Os frascos foram autoclavados e por 15 minutos a 120°C a 1 atm e resfriados à temperatura ambiente para a realização da segunda medição.

A permeabilidade da membrana foi aferida pelo índice de estabilidade da membrana celular (CMS) de acordo com Sullivan & Ross (1979) e calculada usando a seguinte equação:

$$\%CMS = \frac{1 - \frac{T1}{T2}}{1 - \frac{C1}{C2}} * 100$$

As letras T e C são as condutividades das amostras dos tratamentos e controle, respectivamente. T1 e T2 correspondem a primeira e segunda condutividade da solução determinada para amostras tratadas, e C1 e C2 são os respectivos valores para o controle. Os resultados foram expressos em % em relação ao controle.

### 3.7. Análises bioquímicas

Para as análises bioquímicas que necessitam de material fresco, tanto sementes recém-germinadas como plântulas foram congeladas em nitrogênio líquido no momento da coleta e armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  até o momento das análises. Para sementes o tegumento foi retirado em momentos antes dos ensaios bioquímicos, e então, sementes e plântulas foram maceradas com  $\text{N}_2$  líquido em um *pool* por cada repetição. Para as análises que necessitam de matéria seca, sementes sem tegumentos e plântulas foram levadas à estufa de circulação forçada a  $60^{\circ}\text{C}$  por 72h. Para todas as análises bioquímicas, cada repetição consistiu num *pool* de 25 sementes ou 05 plântulas maceradas.

#### 3.7.1. Extração de açúcares solúveis totais e aminoácidos

Seguindo a metodologia descrita por Zanandrea *et al.* (2010), foram utilizados 0,2 g de MS (matéria seca) tanto para sementes e como para plântulas, em 10 mL de tampão fosfato de potássio 0,1 M pH 7,0, seguido de banho-maria por 30 minutos a  $40^{\circ}\text{C}$ . Depois a amostra foi centrifugada a 6.4000 rpm durante 10 minutos. Posteriormente houve o armazenamento em potes plásticos devidamente identificados a  $-20^{\circ}\text{C}$ . As alíquotas do sobrenadante serviram para as análises de açúcares solúveis totais e aminoácidos solúveis totais.

##### 3.7.1.1. Quantificação de açúcares solúveis

Com as alíquotas obtidas do item acima, os açúcares solúveis totais (AST) foram quantificados segundo (YEMM & WILLIS, 1954), os resultados foram calculados com base na curva padrão de glicose e expressos em  $\mu\text{mol AST. g MS}^{-1}$  tendo a leitura em espectrofotômetro realizada a 620nm. Os açúcares redutores (AR) foram quantificados de acordo com a metodologia de (MILLER, 1959), e os resultados foram calculados com base na curva padrão de glicose e expressos em  $\mu\text{mol AR. g MS}^{-1}$  tendo a leitura em espectrofotômetro realizada a 540nm. Os açúcares não-redutores (ANR) foram obtidos pela diferença entre AST e AR.

##### 3.7.1.2. Quantificação de aminoácidos solúveis totais

O método descrito por Yemm & Cocking (1955) foi utilizado para quantificar as variações na concentração de aminoácidos solúveis totais presentes nas sementes e nas plântulas. Após a obtenção do extrato no volume de 1 ml, foram adicionados 500  $\mu\text{l}$  tampão citrato de sódio 0,2 M, pH= 5,8, 200  $\mu\text{l}$  solução ninhidrina 5% em éter monometílico de etilenoglicol + 1 ml de solução KCN 0,0002 M. O ensaio foi aquecido a  $100^{\circ}\text{C}$  em banho-maria por 20 minutos e, após, resfriado por 10 minutos acrescentou-se 1 ml de álcool etílico 60%, seguindo-se leitura em espectrofotômetro em 570nm e os resultados foram expressos em  $\mu\text{mol.gMS}^{-1}$ .

### 3.7.2. Quantificação de prolina

O método utilizado foi o descrito por (CARILLO & GIBBON, 2011). Amostras com 0,1 g de matéria fresca de plântulas foram homogeneizadas com etanol 60% e centrifugadas a 14000g durante 5 minutos. Em tubo de ensaio contendo 0,5 ml do sobrenadante, foi adicionado 1 ml de ninhidrina 1% em ácido acético 60% e etanol 20%. Em seguida, as amostras foram mantidas 20 min em banho-maria a 95° C. Após o resfriamento, por imersão em banho de gelo, foi adicionado 1 ml de etanol 60%, realizada a leitura em espectrofotômetro a 520 nm. As absorbâncias obtidas foram comparadas com a curva-padrão de prolina. Os resultados obtidos expressos em microgramas de prolina por  $\mu\text{g} \cdot \text{mgMS}^{-1}$

### 3.7.3. Extração e quantificação de proteínas totais

A quantificação de proteínas solúveis totais, 0,1 g de sementes e plântulas (matéria fresca) foram maceradas em  $\text{N}_2$  líquido e homogeneizadas com 750  $\mu\text{l}$  de tampão fosfato (100 mM pH 7,8) contendo 100 mM de ácido etilenodiaminatetracético (EDTA), 1 mM de ácido ascórbico e 5% de polivinilpirrolidona (PVPP) (GOMES; SOARES & GARCIA, 2014). O sobrenadante foi coletado e uma alíquota do extrato foi retirada e misturada com o reagente de Bradford. As proteínas solúveis totais foram determinadas em espectrofotômetro com absorbância de 595 nm, de acordo com o método descrito por (BRADFORD, 1976) e os resultados foram expressos em  $\text{mg g}^{-1}\text{MF}$ .

### 3.7.4. Extração e quantificação do peróxido de hidrogênio

Os níveis de peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) foram quantificados pelo método de Velikova *et al.* (2000). 0,1 g de sementes ou plântulas foram maceradas em  $\text{N}_2$  e homogeneizadas com 1,5 mL de ácido tricloroacético (TCA) a 0,1%. As amostras foram centrifugadas e a reação foi realizada com tampão fosfato de potássio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 10mM, pH 7,0 e iodeto de potássio (KI) a 1M. As amostras foram analisadas em espectrofotômetro a 390 nm e os níveis de  $\text{H}_2\text{O}_2$  foram quantificados por meio de curva padrão. Os resultados foram expressos em  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $\mu\text{mol} \cdot \text{g MF}$ ).

### 3.7.5. Extração de enzimas do sistema antioxidante

Para a extração enzimática (catalase – CAT, superóxido dismutase – SOD e ascorbato peroxidase – APX), 0,1 g de sementes e plântulas foram maceradas em  $\text{N}_2$  líquido e homogeneizadas com 750  $\mu\text{l}$  de tampão fosfato (100 mM pH 7,8) contendo 100 mM de ácido etilenodiaminatetracético (EDTA), 1 mM de ácido ascórbico e 5% de polivinilpirrolidona (PVPP) (GOMES *et al.* 2014).

### 3.7.5.1. Catalase (CAT)

O meio de reação para CAT foi composto por tampão fosfato de potássio 67 mM (pH 7,0), 10 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e extrato enzimático. O consumo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi mensurado a 240 nM conforme descrito por Anderson et al. (1995). Os resultados foram expressos em CAT atividade ( $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  proteína).

### 3.7.5.2. Ascorbato peroxidase (APX)

A atividade da APX foi aferida da em meio composto por 50 mM de tampão fosfato (pH 7,0), 0,5 mM de ácido ascórbico, 2 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e quantidade adequada de extrato enzimático. A oxidação do ascorbato foi feita à leitura à 290 nm seguindo Nakano e Asada (1981). Os resultados foram expressos em APX atividade ( $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  proteína).

### 3.7.5.3. Superóxido dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi medida em meio de reação contendo 50 mM de tampão fosfato (pH 7,8), 13 mM de L-metionina, 0,1 mM de EDTA, 0,002 mM de riboflavina e 0,075 mM de NBT, segundo descrito por Giannopolitis e Ries (1977). A reação foi conduzida em luz fluorescente (15 W) por 10 minutos enquanto o controle (sem amostra) foi mantido no escuro à temperatura ambiente. Foi feita a leitura no espectrofotômetro à 575 nm. Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir em 50% a redução do NBT. Os resultados foram expressos SOD atividade ( $\text{U min}^{-1} \text{ g proteína}^{-1}$ ).

### 3.7.6. Pigmentos

Seguiu-se o método de Lichtenthaler, Buschmann (2001) para a quantificação de clorofilas. As folhas foram coletadas em papel alumínio devidamente identificadas e mantidas em gelo. Foram maceradas 0,1 g de massa fresca foliar em 5 mL de acetona 80%. Logo após os extratos foram filtrados, e o volume foi completado com acetona 80% para 10mL. As leituras foram realizadas a 663,2 nm, 646,8 nm e 470 nm em espectrofotômetro.

Os cálculos de  $\mu\text{g}$  de clorofila/g de matéria fresca foliar, seguiram as equações:

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

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

$$\text{Clorofilas totais: } C_a + C_b = (20,20 \times A_{646}) + (8,02 \times A_{663})$$

Os cálculos de  $\mu\text{g}$  de Carotenoides/g de matéria fresca foliar:

$$\text{Carotenoides: } (1000 \times A_{470} - 1,82 \times C_a - 85,02 \times C_b) / 198$$

### 3.8. Fluorescência da clorofila *a*

As medições da fluorescência da clorofila *a* foram realizadas no 50º dia em folhas totalmente expandidas, na parte da manhã, com o fluorômetro portátil Mini-PAM (Heinz Walz GmbH, Effeltrich, Alemanha). Tecidos foliares foram previamente aclimatados ao escuro por 40 min para obter a fluorescência inicial ( $F_0$ ) e a fluorescência máxima ( $F_m$ ). A eficiência quântica máxima do PSII foi então calculada como:

$$F_v/F_m = (F_m - F_0) / F_m$$

O rendimento quântico efetivo do PSII foi calculado como:

$$\phi_{PSII} = (F_m' - F) / F_m'$$

O *quenching* não fotoquímico (NPQ) foi calculado de acordo com Bilger e Bjoërkman (1990), como:

$$NPQ = (F_m - F_m') / F_m'$$

A taxa aparente de transporte de elétrons (ETR) foi calculada de acordo Baker (2008), como:

$$ETR = (\phi_{PSII} * PAR * 0,84 * 0,5)$$

onde PAR é a Radiação fotossinteticamente ativa, 0,84 é o coeficiente de absorção da folha 0,5 representa a contribuição de 50% do PSII para a absorbância total da amostra.

### 3.9. Análises de parâmetros de tolerância

As plântulas foram coletadas após 50 dias para as análises de massa fresca, número de folhas e medidas de comprimento da plântula, da parte aérea e da raiz. Foi realizada a massa seca; e a diferença da massa fresca com a massa seca, proporcionou avaliar o conteúdo de água nas plântulas

O índice de tolerância ao estresse abiótico foi calculado da seguinte forma:

$$(IT = BMT / BMC)$$

onde BMT é a biomassa acumulada em cada tratamento e BMC é a biomassa acumulada no tratamento controle (Rahman et al., 2013).

### 3.10. Análises de acúmulo de metais

A concentração dos metais Fe e Mn nas plântulas foi quantificado por espectrofotometria de absorção atômica após digestão nítrico-perclórica, utilizando 0,1g de massa seca.

O Fator de Transferencia (FT) de cada metal foi determinado pela equação descrita com Lubben & Sauerbeck (1991):

$$FT = (QPA / QR)$$

sendo QPA a quantidade acumulada de cada metal nas plântulas e QR o quantidade total de cada metal acumulado que foi extraída do solo.

A Eficiência de Remoção (E%) de cada metal foi determinada pela seguinte equação (JORGE et al., 2010):

$$E\% = (FT * 100) / N$$

onde FT é o fator de transferência e o N é o numero da repetição de cada tratamento.

### 3.11. Delineamento experimental e análise estatística

Adotou-se delineamento inteiramente casualizado (DIC), com 5 repetições contendo 35 sementes ou 10 plântulas em fatorial 2x5, dois tipos de substratos: latossolo vermelho e rejeito de mineração de ferro e cinco tratamentos de *priming*: 1) Controle (sementes não tratadas); 2) *priming* com H<sub>2</sub>O; 3) *priming* com 200µM NO; 4) *priming* com 100µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e 5) *priming* com 200µM NO+100µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A normalidade dos dados e a homogeneidade das variâncias foram verificadas através dos testes Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente e submetidos à análise de variância fatorial, com dois fatores (nível de significância 5% pelo teste de Tukey), utilizando-se o software livre Rbio©, os gráficos foram produzidos no software SigmaPlot©.

## 4. Resultados

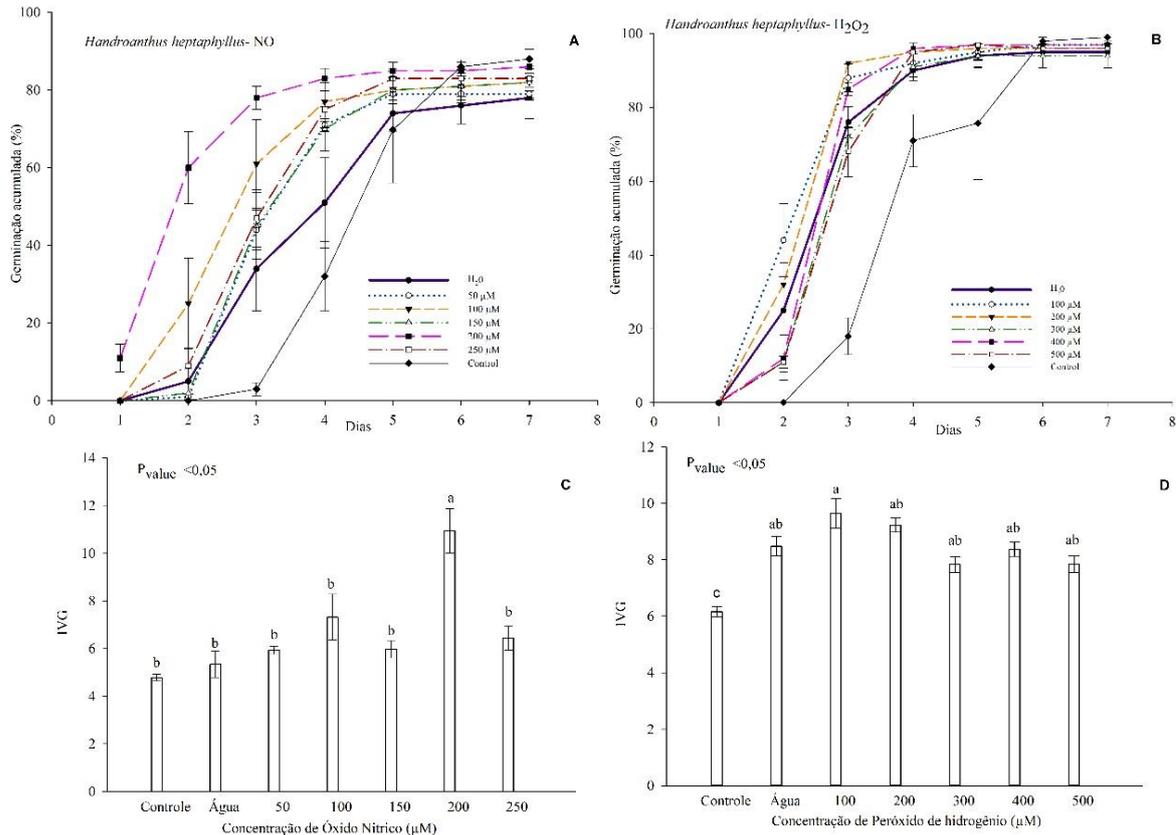
### 4.1. Efeitos do *priming* na germinação de sementes de *H. heptaphyllus*

#### 4.1.1. Efeitos de doses de *priming* de NO e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na germinação de sementes de *H. heptaphyllus* em condições controladas

Em relação às doses testadas de ambos condicionantes, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e NO, observou-se que no tratamento com NO a dose de 200 µM antecipou e uniformizou a germinação (Fig. 2A) e apresentou um maior IVG (Fig. 2C). Para as doses de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nota-se que o tratamento com 100µM apresentou germinação antecipada quando comparada aos demais tratamentos (Fig.

2B) entretanto sem diferenças no IVG nas demais concentrações (Fig. 2D). Dessa forma, as concentrações de 200 $\mu$ M de NO e 100 $\mu$ M de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foram as utilizadas para o *priming*.

Figura 2- Germinação acumulada de sementes pré-condicionadas de *Handroanthus heptaphyllus* com concentrações de NO (A) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (B) e índice de velocidade de germinação (IVG) nas concentrações de NO (C) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (D).

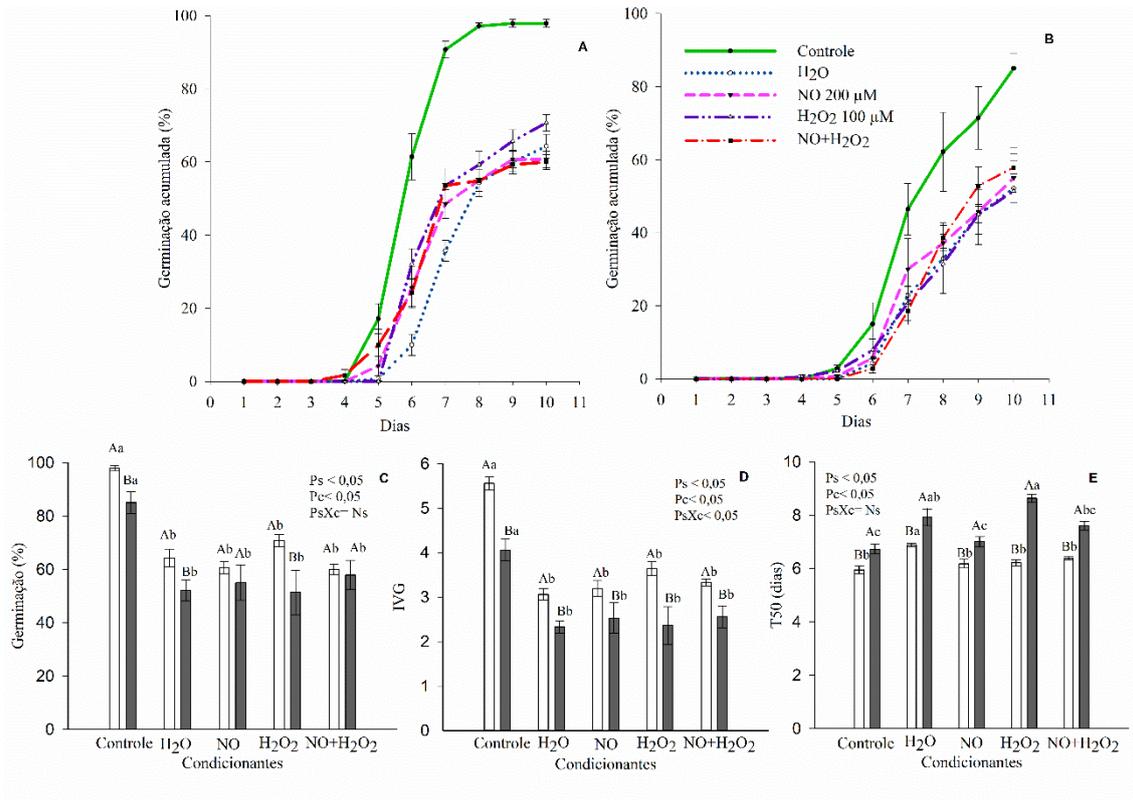


As barras representam as médias  $\pm$  erro padrão. As médias seguidas pelas mesmas letras não apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% de significância. Fonte: Do Autor (2021).

#### 4.1.2. Efeitos do *priming* na germinação de sementes de *H. heptaphyllus* em solo e rejeito de mineração de ferro

A germinação das sementes no rejeito apresentou atraso quando comparadas ao cultivo no solo. Em relação ao cultivo no solo (Fig. 3A), verificou-se que as sementes no controle obtiveram maior germinação acumulada e IVG e menor T50, chegando a cerca de 100% de germinação, enquanto nos tratamentos de *priming* a germinação ficou em torno de 70% (Fig. 3C; 3D; 3E). No rejeito (Fig. 3B), observam-se resultados similares para as mesmas variáveis de germinação, porém houve uma redução do percentual de germinação (Fig. 3C) em relação ao observado no cultivo das sementes no solo. As sementes do controle no rejeito apresentaram germinação final em torno de 80% enquanto as sementes tratadas com os condicionantes apresentaram em torno de 60% de germinação (Fig. 3C).

Figura 3- Germinação acumulada de sementes no solo (A), e no rejeito (B). Porcentagem de germinação (C), Índice de velocidade de germinação - IVG (D) e T50 (E) de sementes de *Handroanthus heptaphyllus* pré-condicionadas (Controle, H<sub>2</sub>O, 200μM NO, 100μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e 200μM NO+100μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e cultivadas em solo e em rejeito de mineradora de ferro.



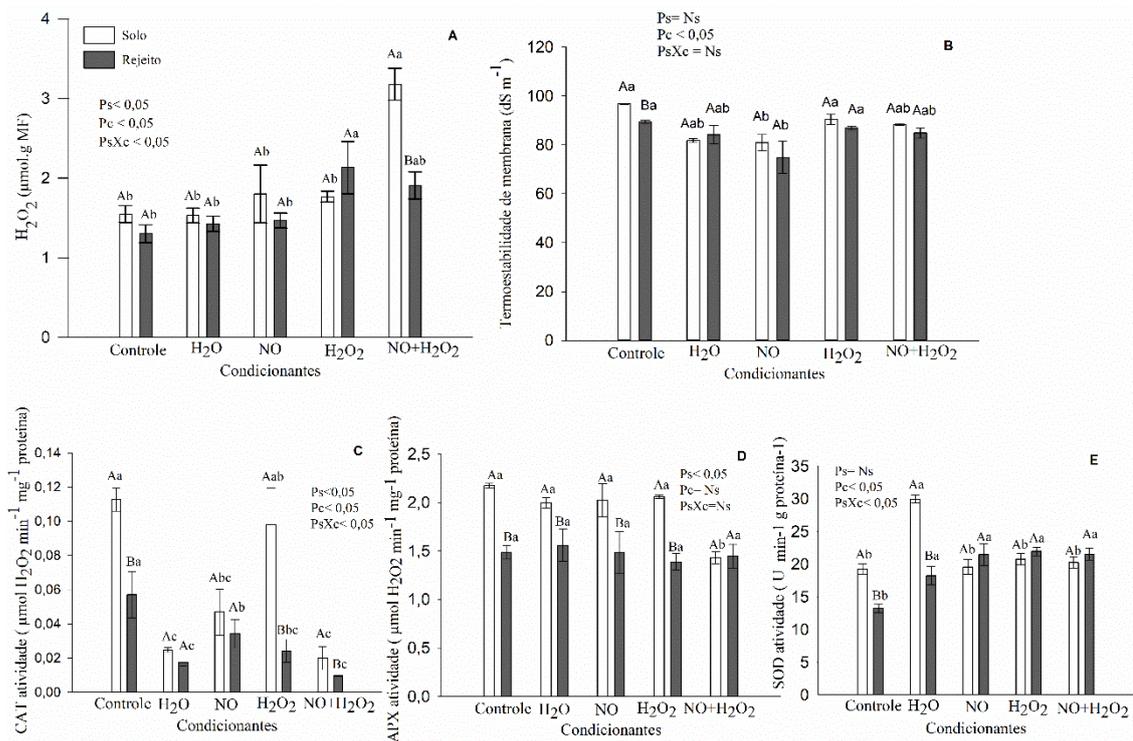
As barras representam as médias  $\pm$  erro padrão. As letras maiúsculas comparam diferenças entre os substratos dentro do mesmo condicionante, e as letras minúsculas comparam os condicionantes dentro do mesmo substrato. As médias seguidas pelas mesmas letras ou *Ns* (Não significativo) não apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% de significância.  $P_s$  = valor de *p* entre os substratos,  $P_c$  = valor de *p* entre os condicionantes e  $P_{sxc}$  = valor de *p* da interação dos substratos e os condicionantes. Fonte: Do Autor (2021).

Em relação às análises bioquímicas, os níveis endógenos de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Fig. 4A) foram maiores nas sementes cultivadas no solo com o condicionante NO+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; para as sementes cultivadas em rejeito, o condicionante H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> apresentou o maior valor de níveis de peróxido de hidrogênio. Em relação à termostabilidade de membrana, todas as condições apresentaram um valor menor que 100 (Fig. 4B).

Dentre as atividades específicas das enzimas do sistema antioxidante, observou-se que a atividade de CAT (Fig. 4C) em sementes cultivadas no solo, o tratamento controle e o

condicionante de  $H_2O_2$  apresentaram as maiores atividades comparados aos demais condicionantes, contudo as baixas atividades de CAT dessas sementes foram encontradas no  $NO+H_2O_2$  para ambos os substratos (Fig. 4C). Para APX (Fig. 4D), as sementes cultivadas no solo, em geral, apresentaram os maiores níveis de atividade específica do que as do rejeito, mostrando um decréscimo na atividade em sementes cultivadas no solo provenientes do condicionante  $NO+H_2O_2$ . Para a atividade específica de SOD (Fig. 4E), as sementes cultivadas no solo apresentaram maiores valores quando tratadas com o condicionante  $H_2O$ . No rejeito, os condicionantes  $H_2O$ ,  $NO$ ,  $H_2O_2$  e  $NO+H_2O_2$  apresentaram uma maior atividade de SOD quando comparada com o controle neste substrato (Fig. 4E).

Figura 4- Níveis endógenos de peróxido de hidrogênio (A), termoestabilidade de membrana (B), atividades específicas de catalase – CAT (C), ascorbato peroxidase- APX (D) e superóxido dismutase- SOD (E) em sementes recém germinadas de *Handroanthus heptaphyllus* pré-condicionadas (Controle,  $H_2O$ ,  $200\mu M$   $NO$ ,  $100\mu M$   $H_2O_2$  e  $200\mu M$   $NO+100\mu M$   $H_2O_2$ ) semeadas em solo e em rejeito de mineradora de ferro.

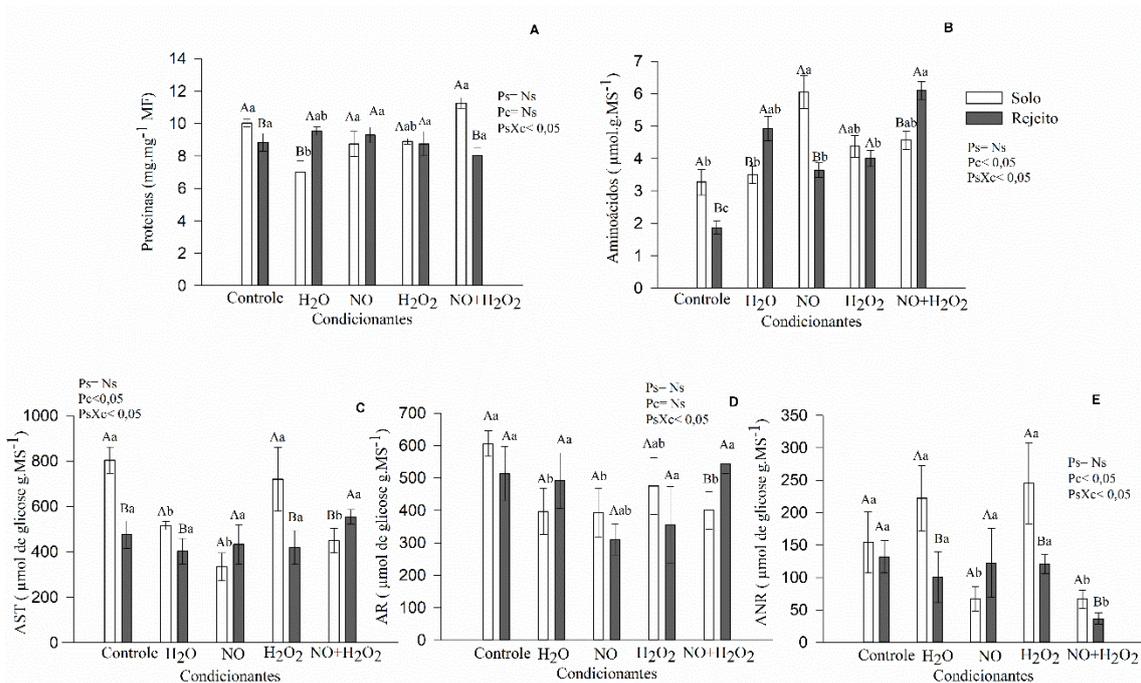


As barras representam as médias  $\pm$  erro padrão. As letras maiúsculas comparam a diferença entre os substratos dentro do mesmo condicionante, e as letras minúsculas comparam os condicionantes dentro do mesmo substrato. As médias seguidas pelas mesmas letras ou *Ns* (Não significativo) não apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey à 5% de significância.  $P_s$  = valor de *p* entre os substratos,  $P_c$  = valor de *p* entre os condicionantes e  $P_{s \times c}$  = valor de *p* da interação dos substratos e os condicionantes. Fonte: Do Autor (2021).

Para as proteínas solúveis totais (Fig. 5A) nas sementes cultivadas no solo, o controle e o condicionante de  $\text{NO}+\text{H}_2\text{O}_2$  apresentaram os maiores valores quando comparados aos demais tratamentos nesse substrato. No rejeito, as sementes tratadas com os condicionantes  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NO}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  e o controle apresentaram valores mais elevados quando comparados ao tratamento  $\text{NO}+\text{H}_2\text{O}_2$  (Fig. 5A). Para aminoácidos totais (Fig. 5B) das sementes cultivadas no solo, os maiores níveis foram encontrados no condicionante com  $\text{NO}$ ; já para o rejeito, o condicionante  $\text{NO}+\text{H}_2\text{O}_2$  resultou em maior valor, mas todos os condicionantes mostraram concentrações maiores do que o controle (Fig. 5B).

Para açúcares solúveis totais (Fig. 5C), em sementes cultivadas no solo, observaram-se elevados níveis no tratamento controle e com o condicionante  $\text{H}_2\text{O}_2$ . No rejeito não houve diferença estatística entre os tratamentos. Em relação aos níveis de açúcares redutores (Fig. 5D), o menor valor foi observado em sementes provenientes do *priming* com  $\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{NO}$  em solo e no rejeito no condicionante  $\text{NO}$ . Para os açúcares não redutores (Fig. 5E) os tratamentos com  $\text{NO}$  e  $\text{NO}+\text{H}_2\text{O}_2$  no solo apresentaram a menor concentração; no rejeito o condicionante  $\text{NO}+\text{H}_2\text{O}_2$  apresentou o menor valor em comparação aos dessas tratamentos desse substrato.

Figura 5- Proteínas solúveis totais (A), aminoácidos totais (B), açúcares solúveis totais- AST (C), açúcares redutores- AR (D) e açúcares não redutores- ANR (E) em sementes recém germinadas de *Handroanthus heptaphyllus* pré-condicionadas (Controle,  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $200\mu\text{M}$   $\text{NO}$ ,  $100\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  e  $200\mu\text{M}$   $\text{NO}+100\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ ) semeadas em solo e em rejeito de mineradora de ferro.

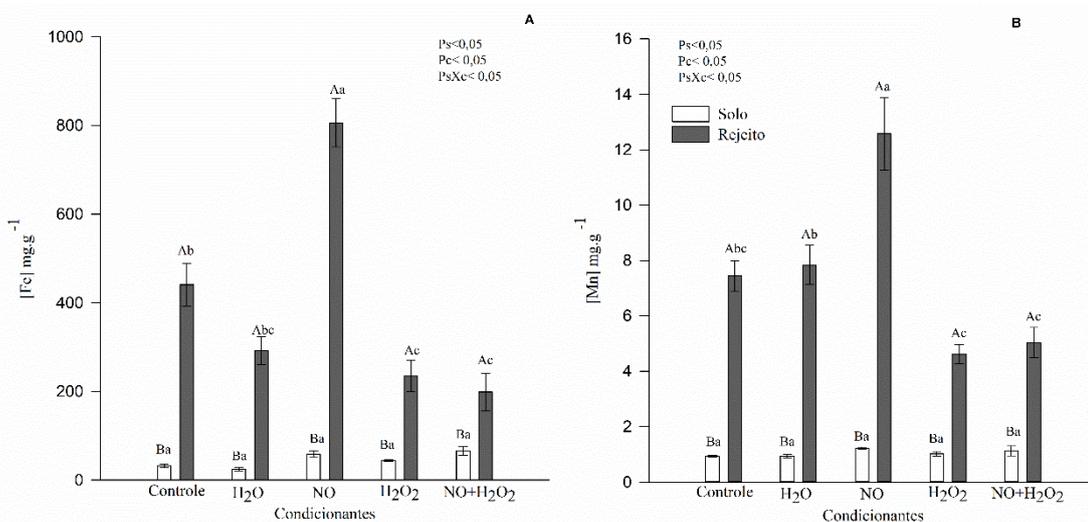


As barras representam as médias  $\pm$  erro padrão. As letras maiúsculas comparam a diferença entre os substratos dentro do mesmo condicionante, e as letras minúsculas comparam os condicionantes dentro do mesmo substrato. As médias seguidas pelas mesmas letras ou *Ns* (Não significativo) não apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey à 5% de significância.  $P_s$ = valor de *p* entre os substratos,  $P_c$ = valor de *p* entre os condicionantes e  $P_{s \times c}$ = valor de *p* da interação dos substratos e os condicionantes. Fonte: Do Autor (2021).

#### 4.2. Efeitos do *priming* no estabelecimento de plântulas de *H. heptaphyllus* cultivadas em solo e rejeito de mineração de ferro

Os acúmulos de ferro (Fig. 6A) e de manganês (Fig. 6B) foram maiores nas plântulas de *H. heptaphyllus* provenientes do *priming* com NO em plântulas cultivadas em rejeito. As plântulas cultivadas em rejeito provenientes dos condicionantes com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e NO+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foram as que menos acumularam esses nutrientes. No cultivo no solo, os tratamentos com *priming* não apresentaram diferença significativa para ambos os nutrientes analisados em relação ao controle.

Figura 6- Concentração de ferro (A) e manganês (B) em plântulas de *Handroanthus heptaphyllus* pré-condicionadas (Controle, H<sub>2</sub>O, 200 $\mu$ M NO, 100 $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e 200 $\mu$ M NO+100 $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) semeadas em solo e em rejeito de mineradora de ferro.



As barras representam as médias  $\pm$  erro padrão. As letras maiúsculas comparam a diferença entre os substratos dentro do mesmo condicionante, e as letras minúsculas comparam os condicionantes dentro do mesmo substrato. As médias seguidas pelas mesmas letras não apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% de significância.  $P_s$ = valor de *p* entre os substratos,  $P_c$ = valor de *p* entre os condicionantes e  $P_{s \times c}$ = valor de *p* da interação dos substratos e os condicionantes. Fonte: Do Autor (2021).

Para os parâmetros de tolerância das plântulas aos metais Fe e Mn (Tabela. 2), observa-se que no solo não houve diferença entre os condicionantes em ambos metais para as variáveis fator de transferência (FT) e a eficiência de remoção (E%) e apresentaram um maior índice de

tolerância (IT) no solo. Contudo, no rejeito nota-se que os IT variam conforme os tratamentos, no NO observa-se um IT moderado e o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> observa-se um IT tolerante alto (Tabela. 2).

Tabela 2- Índice de tolerância (IT), Fator de transferência (FT) e Eficiência de remoção (E%) para ferro e manganês em plântulas de *Handroanthus heptaphyllus* pré-condicionadas (Controle, H<sub>2</sub>O, 200µM NO, 100µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e 200µM NO+100µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) semeadas em solo e em rejeito de mineradora de ferro.

Tratamentos	IT	Fe		Mn		
		FT (mg Kg <sup>-1</sup> )	E (%)	FT (mg Kg <sup>-1</sup> )	E (%)	
<b>Solo</b>	Controle	1,0	0,001±0 <sup>Ba</sup>	0,026± 0,003 <sup>Ba</sup>	0,0002 ± 0 <sup>Ba</sup>	0,004± 0 <sup>Ba</sup>
	H <sub>2</sub> O	1,16	0,001±0 <sup>Ba</sup>	0,020± 0,020 <sup>Ba</sup>	0,0002± 0 <sup>Ba</sup>	0,004± 0 <sup>Ba</sup>
	NO	1,05	0,002±0 <sup>Ba</sup>	0,048± 0,006 <sup>Ba</sup>	0,0003± 0 <sup>Ba</sup>	0,005± 0 <sup>Ba</sup>
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1,10	0,002±0 <sup>Ba</sup>	0,036± 0,002 <sup>Ba</sup>	0,0002± 0 <sup>Ba</sup>	0,004± 0 <sup>Ba</sup>
	NO+H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1,18	0,003±0 <sup>Ba</sup>	0,054± 0,008 <sup>Ba</sup>	0,0002± 0 <sup>Ba</sup>	0,005± 0,001 <sup>Ba</sup>
<b>Rejeito</b>	Controle	0,59	0,033± 0,004 <sup>Ab</sup>	0,666± 0,074 <sup>Ab</sup>	0,0007± 0 <sup>Abc</sup>	0,014± 0,001 <sup>Abc</sup>
	H <sub>2</sub> O	0,60	0,022± 0,002 <sup>Abc</sup>	0,441± 0,047 <sup>Abc</sup>	0,0008± 0 <sup>Ab</sup>	0,015± 0,001 <sup>Ab</sup>
	NO	0,46	0,061± 0,003 <sup>Aa</sup>	1,218± 0,082 <sup>Aa</sup>	0,0012± 0 <sup>Aa</sup>	0,024± 0,003 <sup>Aa</sup>
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0,80	0,018± 0,003 <sup>Ac</sup>	0,355± 0,054 <sup>Ac</sup>	0,0004± 0 <sup>Ac</sup>	0,009± 0,001 <sup>Ac</sup>
	NO+H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0,69	0,015± 0,003 <sup>Ac</sup>	0,300± 0,064 <sup>Ac</sup>	0,0005± 0 <sup>Ac</sup>	0,010± 0,001 <sup>Abc</sup>
Ps		< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05
Pc		< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05
PsXc		< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05

As letras maiúsculas comparam a diferença entre os substratos dentro do mesmo condicionante, e as letras minúsculas comparam os condicionantes dentro do mesmo substrato. As médias seguidas pelas mesmas letras não apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey à 5% de significância. P<sub>s</sub>= valor de *p* entre os substratos, P<sub>c</sub>= valor de *p* entre os condicionantes e P<sub>sxc</sub>= valor de *p* da interação dos substratos e os condicionantes. Fonte: Do Autor (2021).

De forma geral, no solo as plântulas de *H. heptaphyllus* apresentaram um maior comprimento total, de parte aérea, radicular e números de par de folhas (Tabela 3) do que no rejeito. Contudo, no rejeito as plântulas com o condicionante de NO mostrou um maior comprimento da raiz quando comparado com o solo, e as plântulas com o condicionante de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> apresentou o maior comprimento de raiz entre os tratamentos no rejeito.

Tabela 3- Comprimento da plântula, da parte aérea, radicular e número de par de folhas aos 50 dias em plântulas de *Handroanthus heptaphyllus* pré-condicionadas (Controle, H<sub>2</sub>O, 200µM NO, 100µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e 200µM NO+100µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) semeadas em solo e em rejeito de mineradora de ferro.

	Tratamentos	Comprimento da plântula (cm)	Comprimento Parte aérea (cm)	Comprimento Radicular (cm)	Par de folhas
<b>Solo</b>	Controle	15,73 $\pm$ 0,36 <sup>Ab</sup>	8,93 $\pm$ 0,18 <sup>Aa</sup>	6,80 $\pm$ 0,20 <sup>Aab</sup>	1,9 $\pm$ 0,1 <sup>Aa</sup>
	H <sub>2</sub> O	17,82 $\pm$ 1,07 <sup>Aa</sup>	9,18 $\pm$ 0,45 <sup>Aa</sup>	8,64 $\pm$ 0,70 <sup>Aa</sup>	2,0 $\pm$ 0 <sup>Aa</sup>
	NO	15,37 $\pm$ 0,29 <sup>Ab</sup>	8,96 $\pm$ 0,26 <sup>Aa</sup>	6,41 $\pm$ 0,10 <sup>Bb</sup>	1,9 $\pm$ 0,1 <sup>Aa</sup>
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	17,19 $\pm$ 0,37 <sup>Aa</sup>	9,32 $\pm$ 0,26 <sup>Aa</sup>	7,88 $\pm$ 0,20 <sup>Aab</sup>	2,0 $\pm$ 0 <sup>Aa</sup>
	NO+H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	17,83 $\pm$ 0,69 <sup>Aa</sup>	9,73 $\pm$ 0,25 <sup>Aa</sup>	8,10 $\pm$ 0,50 <sup>Aab</sup>	2,0 $\pm$ 0 <sup>Aa</sup>
<b>Rejeito</b>	Controle	13,24 $\pm$ 0,77 <sup>Ba</sup>	7,38 $\pm$ 0,23 <sup>Ba</sup>	5,86 $\pm$ 0,59 <sup>Bb</sup>	1,0 $\pm$ 0 <sup>Ba</sup>
	H <sub>2</sub> O	14,18 $\pm$ 0,16 <sup>Ba</sup>	7,70 $\pm$ 0,28 <sup>Ba</sup>	6,49 $\pm$ 0,25 <sup>Bb</sup>	1,1 $\pm$ 0,1 <sup>Ba</sup>
	NO	14,02 $\pm$ 0,36 <sup>Ba</sup>	6,61 $\pm$ 0,38 <sup>Ba</sup>	7,41 $\pm$ 0,43 <sup>Aa</sup>	1,0 $\pm$ 0 <sup>Ba</sup>
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	15,53 $\pm$ 0,27 <sup>Ba</sup>	7,88 $\pm$ 0,17 <sup>Ba</sup>	7,64 $\pm$ 0,19 <sup>Aa</sup>	1,0 $\pm$ 0 <sup>Ba</sup>
	NO+H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	13,88 $\pm$ 0,35 <sup>Ba</sup>	7,37 $\pm$ 0,24 <sup>Ba</sup>	6,51 $\pm$ 0,29 <sup>Bb</sup>	1,0 $\pm$ 0 <sup>Ba</sup>
	Ps	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
	Pc	<0,05	Ns	Ns	Ns
	PsXc	Ns	Ns	<0,05	Ns

As letras maiúsculas comparam a diferença entre os substratos dentro do mesmo condicionante, e as letras minúsculas comparam os condicionantes dentro do mesmo substrato. As médias seguidas pelas mesmas letras ou *Ns* (Não significativa) não apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey à 5% de significância. *P<sub>s</sub>*= valor de *p* entre os substratos, *P<sub>c</sub>*= valor de *p* entre os condicionantes e *P<sub>sxc</sub>*= valor de *p* da interação dos substratos e os condicionantes. Fonte: Do Autor (2021).

Para a biomassa total da parte aérea e radicular (Tabela 4), as plântulas dos tratamentos no solo apresentaram os maiores valores quando comparado com o rejeito. Porém, as plântulas do condicionante de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> apresentou a maior biomassa total e radicular quando comparados com os demais tratamentos no rejeito.

Tabela 4- Biomassa total, da parte aérea e radicular aos 50 dias em plântulas de *Handroanthus heptaphyllus* pré-condicionadas (Controle, H<sub>2</sub>O, 200 $\mu$ M NO, 100 $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e 200 $\mu$ M NO+100 $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) semeadas em solo e em rejeito de mineradora de ferro.

	Tratamentos	Biomassa Total (g)	Biomassa Parte aérea (g)	Biomassa Radicular (g)
<b>Solo</b>	Controle	0,46 $\pm$ 0,02 <sup>Aa</sup>	0,36 $\pm$ 0,02 <sup>Aa</sup>	0,09 $\pm$ 0 <sup>Aa</sup>
	H <sub>2</sub> O	0,53 $\pm$ 0,03 <sup>Aa</sup>	0,42 $\pm$ 0,02 <sup>Aa</sup>	0,11 $\pm$ 0,01 <sup>Aa</sup>
	NO	0,48 $\pm$ 0,01 <sup>Aa</sup>	0,38 $\pm$ 0,01 <sup>Aa</sup>	0,11 $\pm$ 0,01 <sup>Aa</sup>
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0,50 $\pm$ 0,01 <sup>Aa</sup>	0,40 $\pm$ 0,01 <sup>Aa</sup>	0,10 $\pm$ 0 <sup>Aa</sup>
	NO+H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0,54 $\pm$ 0,02 <sup>Aa</sup>	0,43 $\pm$ 0,01 <sup>Aa</sup>	0,10 $\pm$ 0,01 <sup>Aa</sup>
<b>Rejeito</b>	Controle	0,27 $\pm$ 0,02 <sup>Bb</sup>	0,19 $\pm$ 0,02 <sup>Ba</sup>	0,08 $\pm$ 0 <sup>Bab</sup>
	H <sub>2</sub> O	0,27 $\pm$ 0,02 <sup>Bb</sup>	0,21 $\pm$ 0,02 <sup>Ba</sup>	0,07 $\pm$ 0 <sup>Bb</sup>
	NO	0,25 $\pm$ 0,03 <sup>Bb</sup>	0,20 $\pm$ 0,02 <sup>Ba</sup>	0,05 $\pm$ 0,01 <sup>Bb</sup>
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0,37 $\pm$ 0,03 <sup>Ba</sup>	0,27 $\pm$ 0,02 <sup>Ba</sup>	0,10 $\pm$ 0,01 <sup>Ba</sup>
	NO+H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0,32 $\pm$ 0,01 <sup>Bb</sup>	0,24 $\pm$ 0,01 <sup>Ba</sup>	0,07 $\pm$ 0,01 <sup>Bab</sup>
	Ps	<0,05	<0,05	<0,05
	Pc	<0,05	<0,05	Ns
	PsXc	Ns	Ns	<0,05

As letras maiúsculas comparam a diferença entre os substratos dentro do mesmo condicionante, e as letras minúsculas comparam os condicionantes dentro do mesmo substrato. As médias seguidas pelas mesmas letras ou *Ns* (Não significativa) não apresentam diferença significativa

pelo teste de Tukey à 5% de significância.  $P_s$ = valor de  $p$  entre os substratos,  $P_c$ = valor de  $p$  entre os condicionantes e  $P_{sxc}$ = valor de  $p$  da interação dos substratos e os condicionantes. Fonte: Do Autor (2021).

Quando avaliado o conteúdo de água presente na parte aérea e radicular (Tabela 5), observa-se que as plântulas no solo houveram um maior conteúdo de água que as plântulas no rejeito, não havendo diferença estatística entre os condicionantes em ambos os substratos.

Tabela 5- Conteúdo de água da parte aérea e radicular de plântulas de *Handroanthus heptaphyllus* pré-condicionadas (Controle, H<sub>2</sub>O, 200µM NO, 100µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e 200µM NO+100µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) semeadas em solo e em rejeito de mineradora de ferro.

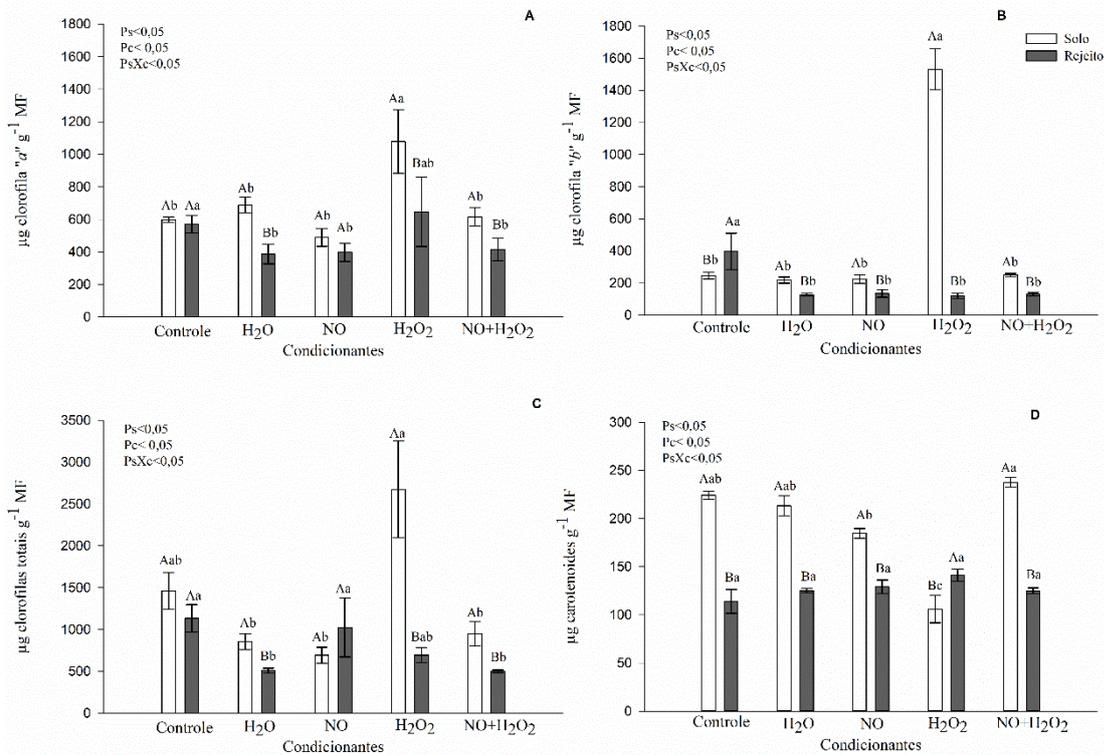
	Tratamentos	Conteúdo de água Parte aérea (%)	Conteúdo de água Radicular (%)
<b>Solo</b>	Controle	42,66 <sup>±</sup> 1,56 <sup>Aa</sup>	17,23 <sup>±</sup> 0,54 <sup>Aa</sup>
	H <sub>2</sub> O	46,88 <sup>±</sup> 2,52 <sup>Aa</sup>	16,96 <sup>±</sup> 1,88 <sup>Aa</sup>
	NO	42,83 <sup>±</sup> 0,99 <sup>Aa</sup>	16,86 <sup>±</sup> 1,86 <sup>Aa</sup>
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	44,38 <sup>±</sup> 1,36 <sup>Aa</sup>	13,71 <sup>±</sup> 0,31 <sup>Aa</sup>
	NO+H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	48,58 <sup>±</sup> 1,37 <sup>Aa</sup>	15,83 <sup>±</sup> 0,75 <sup>Aa</sup>
<b>Rejeito</b>	Controle	22,99 <sup>±</sup> 0,04 <sup>Ba</sup>	9,10 <sup>±</sup> 0,01 <sup>Ba</sup>
	H <sub>2</sub> O	30,65 <sup>±</sup> 3,41 <sup>Ba</sup>	10,37 <sup>±</sup> 0,65 <sup>Ba</sup>
	NO	23,30 <sup>±</sup> 2,38 <sup>Ba</sup>	10,47 <sup>±</sup> 1,53 <sup>Ba</sup>
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	31,20 <sup>±</sup> 0,98 <sup>Ba</sup>	12,86 <sup>±</sup> 0,96 <sup>Ba</sup>
	NO+H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	25,77 <sup>±</sup> 0,59 <sup>Ba</sup>	9,38 <sup>±</sup> 0,29 <sup>Ba</sup>
	Ps	<0,05	<0,05
	Pc	<0,05	Ns
	PsXc	Ns	Ns

As letras maiúsculas comparam a diferença entre os substratos dentro do mesmo condicionante, e as letras minúsculas comparam os condicionantes dentro do mesmo substrato. As médias seguidas pelas mesmas letras ou Ns (Não significativa) não apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey à 5% de significância.  $P_s$ = valor de  $p$  entre os substratos,  $P_c$ = valor de  $p$  entre os condicionantes e  $P_{sxc}$ = valor de  $p$  da interação dos substratos e os condicionantes. Fonte:Do Autor (2021).

Em relação aos níveis de clorofila *a* (Fig. 7A) clorofila *b* (Fig. 7B) e clorofilas totais (Fig. 7C), observa-se maiores níveis nas folhas no condicionante H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no solo quando comparados aos outros condicionantes e quando comparado as folhas das plântulas no rejeito. Quando cultivadas no rejeito, as plântulas do controle apresentaram a maior concentração de clorofila *a* (Fig. 7A) clorofila *b* (Fig. 7B) do que as plântulas dos demais tratamentos, clorofilas totais apresentaram um maior valor em folhas de plântulas no controle e no condicionante de NO em relação aos demais condicionantes. O conteúdo de carotenoides em plântulas provenientes do condicionamento em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> apresentou maiores valores no rejeito do que no solo.

Figura 7- Teores de clorofilas *a* (A), clorofilas *b* (B), clorofilas totais (C) e carotenoides (D) em folhas de plântulas de *Handroanthus heptaphyllus*

pré-condicionadas (Controle, H<sub>2</sub>O, 200μM NO, 100μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e 200μM NO+100μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) semeadas em solo e em rejeito de mineradora de ferro.



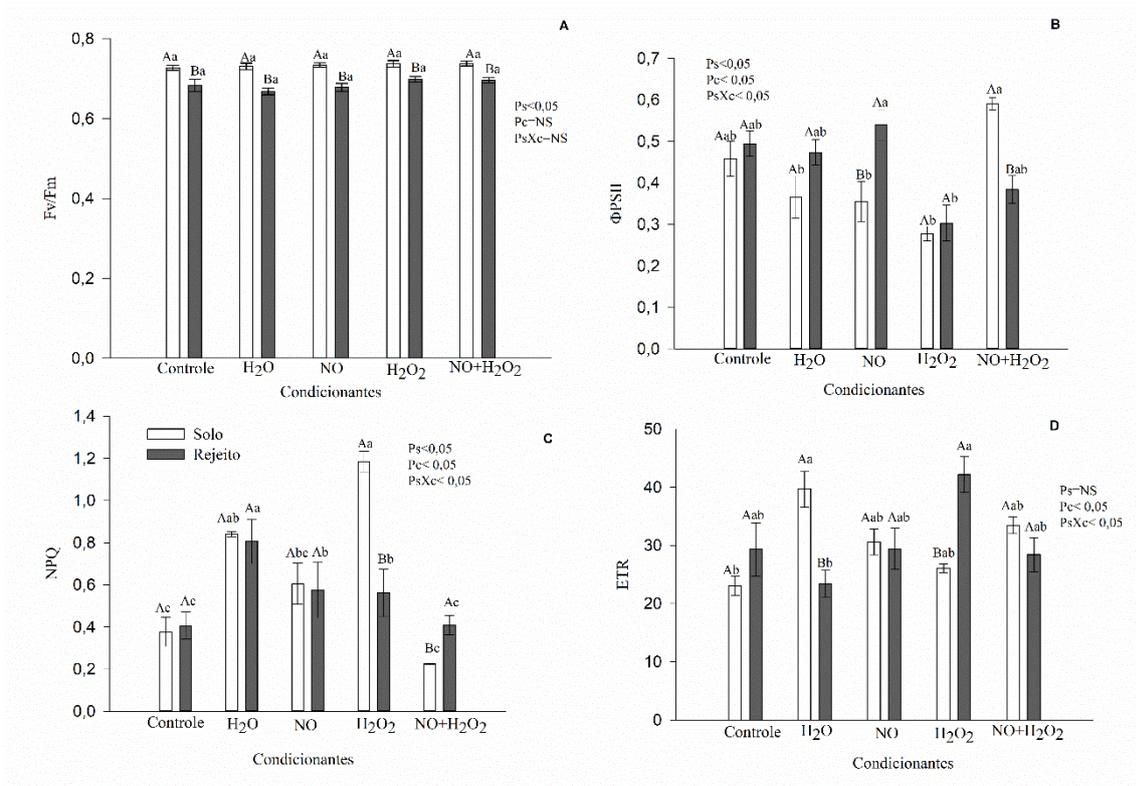
As barras representam as médias  $\pm$  erro padrão. As letras maiúsculas comparam a diferença entre os substratos dentro do mesmo condicionante, e as letras minúsculas comparam os condicionantes dentro do mesmo substrato. As médias seguidas pelas mesmas letras não apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey à 5% de significância.  $P_s$ = valor de  $p$  entre os substratos,  $P_c$ = valor de  $p$  entre os condicionantes e  $P_{s \times c}$ = valor de  $p$  da interação dos substratos e os condicionantes. Fonte: Do Autor (2021).

Avaliando a fluorescência da clorofila  $a$ , nota-se que o rendimento quântico máximo do PSII ( $F_v/F_m$ ) (Fig. 8A) apresentou um decréscimo nas plântulas dos tratamentos no rejeito quando comparados com o solo, não mostrando diferença estatística dentro dos tratamentos em ambos os substratos. Quanto ao rendimento quântico efetivo do PSII ( $\Phi$ PSII) (Fig. 8B), nota-se que no solo, as plântulas com o condicionante de NO resultou em valores de  $\Phi$ PSII significativamente maiores nas plântulas cultivadas no rejeito em relação àquelas cultivadas no solo, observe-se também que no rejeito, somente as plântulas oriundas do condicionante com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> apresentaram menor  $\Phi$ PSII. As plântulas provenientes do condicionante com NO+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> apresentou o maior valor em comparação as plântulas dos outros tratamentos.

Em relação ao *quenching* não fotoquímico (NPQ) (Fig. 8C), as plântulas provenientes do condicionante com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> apresentaram um maior valor quando cultivadas no solo

comparado ao rejeito. No rejeito, as plântulas do condicionante com H<sub>2</sub>O apresentaram valor mais elevado que os demais tratamentos, seguido pelas plântulas com os condicionantes NO e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Fig. 8C). O ETR (Fig. 8D) apresentou maiores valores em plântulas provenientes do condicionante com H<sub>2</sub>O e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> cultivadas no solo e no rejeito, respectivamente em relação aos outros condicionantes.

Figura 8- Rendimento quântico máximo- Fv/Fm (A), rendimento quântico do fluxo de elétrons através do PSII- ΦPSII (B), *quenching* não fotoquímico- NPQ (C) e a taxa de transporte de elétrons- ETR (D) em folhas de plântulas de *Handroanthus heptaphyllus* pré-condicionadas (Controle, H<sub>2</sub>O, 200μM NO, 100μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e 200μM NO+100μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) semeadas em solo e em rejeito de mineradora de ferro.

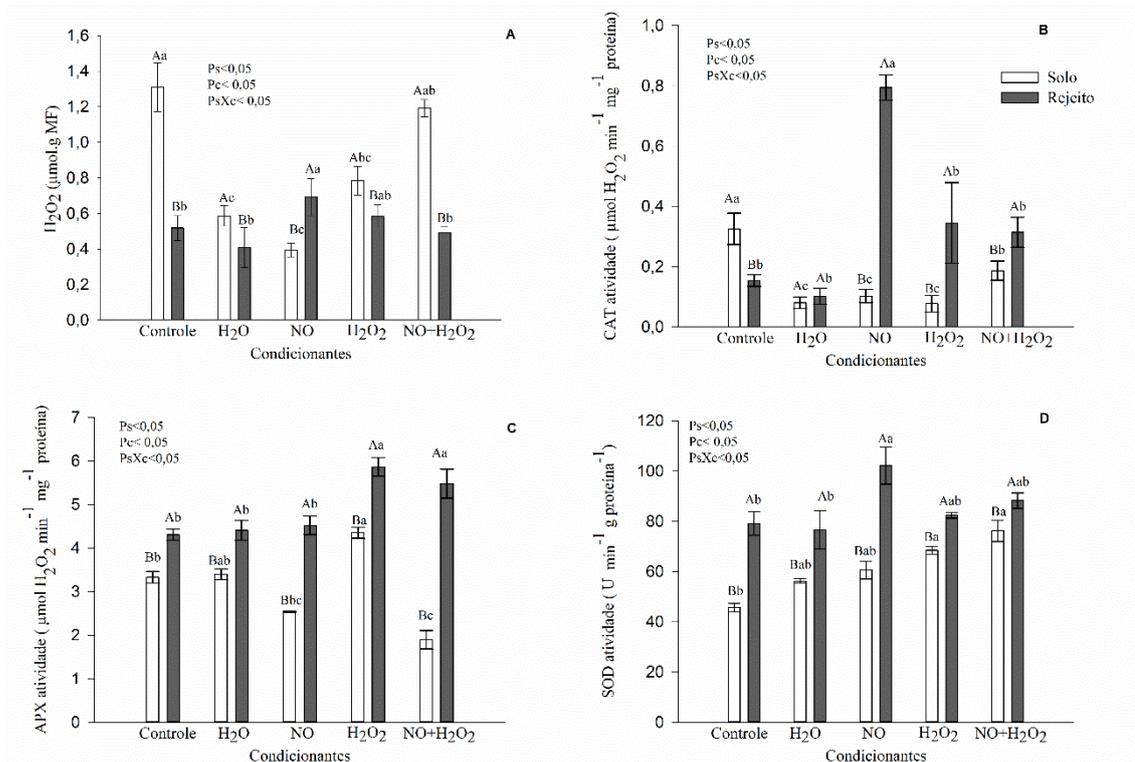


As barras representam as médias  $\pm$  erro padrão. As letras maiúsculas comparam a diferença entre os substratos dentro do mesmo condicionante, e as letras minúsculas comparam os condicionantes dentro do mesmo substrato. As médias seguidas pelas mesmas letras ou Ns (Não significativa) não apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey à 5% de significância. P<sub>s</sub>= valor de p entre os substratos, P<sub>c</sub>= valor de p entre os condicionantes e P<sub>sxc</sub>= valor de p da interação dos substratos e os condicionantes. Fonte: Do Autor (2021).

Os níveis endógenos de peróxido de hidrogênio (Fig. 9A) mostraram os maiores valores em plântulas cultivadas no solo provenientes dos tratamentos controle e NO+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> quando comparados as plântulas dos demais tratamentos nesse substrato. No rejeito, o único

tratamento que apresentou maiores níveis de  $H_2O_2$  que no solo foi nas plântulas proveniente do condicionante com NO. Avaliando as atividades específicas das enzimas do sistema antioxidante, observou-se que a CAT (Fig. 9B) em plântulas cultivadas no solo apresentou maior atividade no controle que os demais tratamentos. Em plântulas cultivadas no rejeito, observa-se maior atividade de CAT que no solo nos condicionantes NO,  $H_2O_2$  e NO+ $H_2O_2$  porém, sendo o tratamento com o condicionante de NO apresentando a maior atividade entre os condicionantes no rejeito. Quanto à atividade da APX (Fig. 9C), as plântulas cultivadas no rejeito apresentaram maiores níveis em relação as plântulas do solo, com maiores atividade nos condicionantes  $H_2O_2$  e NO+ $H_2O_2$  no rejeito. Para a atividade específica de SOD (Fig. 9D), também observaram-se maiores atividades nas plântulas nos tratamentos no rejeito do que no solo, mostrando uma maior atividade em plântulas provenientes do condicionante NO no rejeito.

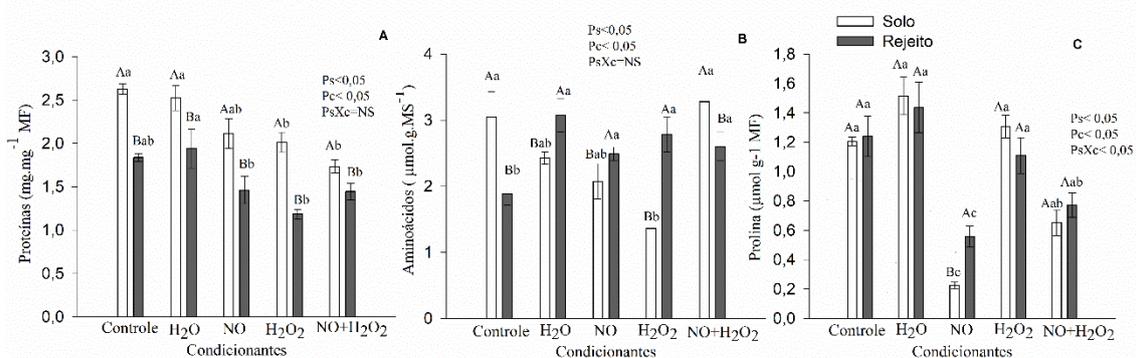
Figura 9- Níveis endógenos de peróxido de hidrogênio (A), atividades específicas de catalase – CAT (B), ascorbato peroxidase- APX (C) e superóxido dismutase- SOD (D) em plântulas de *Handroanthus heptaphyllus* pré-condicionadas (Controle,  $H_2O$ , 200 $\mu$ M NO, 100 $\mu$ M  $H_2O_2$  e 200 $\mu$ M NO+100 $\mu$ M  $H_2O_2$ ) semeadas em solo e em rejeito de mineradora de ferro.



As barras representam as médias  $\pm$  erro padrão. As letras maiúsculas comparam a diferença entre os substratos dentro do mesmo condicionante, e as letras minúsculas comparam os condicionantes dentro do mesmo substrato. As médias seguidas pelas mesmas letras não apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey à 5% de significância.  $P_s$ = valor de  $p$  entre os substratos,  $P_c$ = valor de  $p$  entre os condicionantes e  $P_{s \times c}$ = valor de  $p$  da interação dos substratos e os condicionantes. Fonte: Do Autor (2021).

Verifica-se um decréscimo do teor de proteínas solúveis totais em plântulas cultivadas no rejeito quando comparado com o solo (Fig. 10A). No solo, verificaram-se maiores concentrações de proteínas em plântulas nos tratamentos controle e H<sub>2</sub>O. Para aminoácidos totais (Fig. 10B) em plântulas cultivadas no solo, as maiores concentrações estão presentes no controle e no condicionante NO+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, e no rejeito as maiores concentrações foram observadas em plântulas nos condicionantes H<sub>2</sub>O, NO e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em relação ao solo. Os níveis de prolina nas plântulas, (Fig. 10C) mostraram um menor valor no condicionante NO em ambos os substratos quando se compara com os demais tratamentos.

Figura 10- Proteínas solúveis totais (A), aminoácidos totais (B) e prolina (C) em plântulas de *Handroanthus heptaphyllus* pré-condicionadas (Controle, H<sub>2</sub>O, 200 $\mu$ M NO, 100 $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e 200 $\mu$ M NO+100 $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) cultivadas em solo e em rejeito de mineradora de ferro.

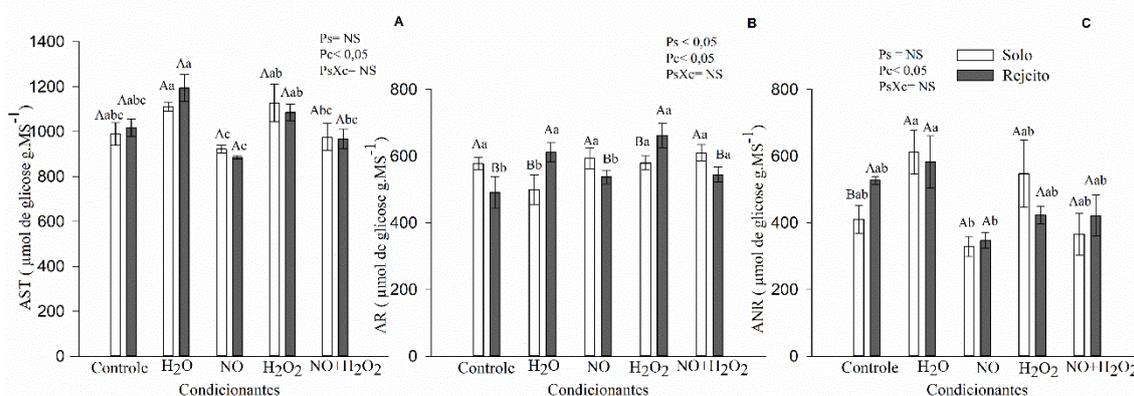


As barras representam as médias  $\pm$  erro padrão. As letras maiúsculas comparam a diferença entre os substratos dentro do mesmo condicionante, e as letras minúsculas comparam os condicionantes dentro do mesmo substrato. As médias seguidas pelas mesmas letras ou  $NS$  (Não significativa) não apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey à 5% de significância.  $P_s$ = valor de  $p$  entre os substratos,  $P_c$ = valor de  $p$  entre os condicionantes e  $P_{s \times c}$ = valor de  $p$  da interação dos substratos e os condicionantes. Fonte: Do Autor (2021).

Os níveis de açúcares solúveis totais (Fig. 11A) mostraram um decréscimo em plântulas condicionadas com NO em ambos os substratos quando se compara com os demais tratamentos. As maiores concentrações de açúcares redutores (Fig. 11B) em plântulas cultivadas no solo foram encontradas nos tratamentos controle, NO e NO+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. No rejeito, os

maiores valores foram verificados nos tratamentos H<sub>2</sub>O e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em comparação ao solo (Fig. 11B). Quanto aos níveis de açúcares não redutores (Fig. 11C), os menores valores foram observados em plântulas provenientes do condicionante NO em ambos os substratos, e os maiores valores estão presentes nas plântulas condicionadas com H<sub>2</sub>O também para ambos os substratos.

Figura 11- Açúcares solúveis totais- AST (A), açúcares redutores- AR (B) e açúcares não redutores- ANR (C) em plântulas de *Handroanthus heptaphyllus* pré-condicionadas (Controle, H<sub>2</sub>O, 200µM NO, 100µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e 200µM NO+100µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) semeadas em solo e em rejeito de mineradora de ferro.



As barras representam as médias  $\pm$  erro padrão. As letras maiúsculas comparam a diferença entre os substratos dentro do mesmo condicionante, e as letras minúsculas comparam os condicionantes dentro do mesmo substrato. As médias seguidas pelas mesmas letras ou *Ns* (Não significativa) não apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey à 5% de significância.  $P_s$  = valor de *p* entre os substratos,  $P_c$  = valor de *p* entre os condicionantes e  $P_{s \times c}$  = valor de *p* da interação dos substratos e os condicionantes. Fonte: Do Autor (2021).

## 5. Discussão

Este trabalho demonstrou que a técnica do *priming*, ou condicionamento fisiológico, em sementes nativas pode ser utilizada com diversos fins em programas de recomposição de ambientes degradados, a depender do tipo de *priming* utilizado. O *priming* acarreta mudanças bioquímicas e fisiológicas nas sementes (PAWAR and LAWARE, 2018) levando à sincronização da germinação e melhora no estabelecimento de plântulas (LECHOWSKA et al., 2019). Entretanto, neste trabalho, a sincronização da germinação com o uso dos condicionantes, só foi percebida quando a germinação foi conduzida em laboratório, com

temperatura e luminosidade controladas. Para as sementes cultivadas em solo e rejeito de mineração em casa de vegetação, verificou-se que os pré-condicionantes não afetaram a sincronização da germinação. A eficiência do *priming* é influenciada por fatores abióticos, como temperatura, disponibilidade de oxigênio e luminosidade (HUSSAIN et al., 2019). Neste trabalho, os tratamentos de *priming* para sementes cultivadas no rejeito mostraram um atraso na germinação em relação ao solo, o que pode ser explicado pela estrutura do rejeito, que devido à sua compactação, forma-se uma fina camada de água e os níveis de oxigênio disponíveis podem ser reduzidos (CRUZ et al., 2020).

A maior formação de  $H_2O_2$  e menores atividades de CAT e APX em sementes cultivadas no solo provenientes do *priming* com  $H_2O_2+NO$  não resultou em perdas ou danos nas membranas, como mostram os resultados de termoestabilidade de membranas. Já foi verificado que o  $H_2O_2$  pode reagir com o NO, produzindo mais ROS, que podem exercer um efeito limitador das atividades de CAT e APX (CORPAS et al., 2015, 2017). Acredita-se que esses níveis internos de  $H_2O_2$  verificados neste trabalho estejam relacionados a níveis de sinalização, se apresentando dentro da “janela oxidativa” conforme descrita por Bailly *et al.*, (2008), na qual os níveis de ROS formadas são controlados, mantendo a homeostase redox. Ademais do sistema antioxidante, as reservas das sementes que passaram ou não pelos tratamentos com os condicionantes, não apresentaram alterações drásticas, porém com aumento dos níveis de aminoácidos no rejeito de mineração de ferro quando comparado com o tratamento controle.

O *priming* não promoveu mudanças significativas nos parâmetros germinativos e bioquímicos de sementes de *H. heptaphyllus* neste trabalho, mas os seus efeitos foram notados a posteriori no estabelecimento das plântulas, principalmente em relação ao acúmulo de Fe e Mn. A maior concentração de Fe e Mn no latossolo vermelho e no rejeito de mineração de ferro, respectivamente, está relacionada à origem da composição do latossolo, rico em íons de ferro (FERNANDES et al., 2004), em ambos os substratos foram relatados pH baixos, o que torna esses dois elementos mais disponíveis para a absorção (ANDRESEN et al., 2018). Entretanto, esse maior conteúdo de ferro disponível no latossolo não resultou em maior absorção pelas plântulas.

As plântulas de ipê-rosa pré-condicionadas com NO quando cultivadas no rejeito acumularam uma concentração de Mn e Fe acima do limite de toxidez nas plantas, sendo o limite de  $10 \text{ mg Kg}^{-1}$  e  $500 \text{ mg Kg}^{-1}$ , respectivamente (MORRIS & PIERRE, 1994; MARSCHNER, 1995). O Fe e o Mn são micronutrientes essenciais para as plantas (KÜPPER,

2017), porém em concentrações elevadas, esses metais podem causar danos oxidativos, inibindo atividades de enzimas antioxidantes, inibindo o crescimento e danos no aparato fotossintético (EL-JAOUAL and COX, 1998, BECKER and ASCH, 2005, TEWARI et al., 2013, e ANDRESEN et al., 2018), contudo esses danos não foram observados ao longo do experimento.

Há relatos na literatura de interações do NO com o Fe, regulando sua homeostase (GRAZIANO & LAMATTINA, 2005) ou como a aplicação de NO deixa o Fe mais disponível (RAMIREZ et al., 2010), mas ainda não se tem conhecimento de relatos sobre como o *priming* de sementes afeta a absorção de Fe pelas plantas. Ademais, este é o primeiro estudo que descreve a interação entre o *priming* com NO aumento a absorção de. Entretanto, há prováveis mecanismos pelos quais a interação NO / Fe / Mn pode ser explicada. O influxo de  $Mn^{2+}$  pode ser mediado pela proteína IRT1 que é a responsável pela absorção de  $Fe^{2+}$  (KORSHUNOVA et al., 1999) sendo assim IRT1 é capaz de transportar tanto Fe como Mn (PEDAS et al., 2008). O NO também pode promover a incorporação de metais no vacúolo, aumentando a síntese de fitoquelatina (ARASIMOWICZ-JELONEK et al., 2011). Entretanto, o mecanismo pelo qual o *priming* com NO promoveu maior absorção de Fe pelas plântulas aqui estudadas ainda é incerto.

Segundo Ci *et al.*, (2010), o índice de tolerância (IT) aos estresses abióticos varia de 0 a 1,0 sendo: i) 0 a 0,2 mostrando que a planta é mais sensível ao contaminante; ii) 0,2 a 0,4 sendo classificada como sensível; iii) 0,4 a 0,6 sendo classificadas como moderadamente tolerante; iv) 0,6 a 0,8 sendo classificadas como tolerante e v) 0,8 a 1,0 é considerado altamente tolerante. Neste trabalho, nota-se que as plântulas de ipê-rosa cultivadas no rejeito de mineração de ferro com o tratamento NO podem ser classificadas como moderadamente tolerantes. Principalmente com relação ao excesso de Fe e Mn, pois como visto, foram as plântulas desse tratamento que mais acumularam ambos os metais. Consequentemente, esses dados demonstram um fator de transferência e de eficiência de remoção. Por outro lado, o tratamento com  $H_2O_2$  no rejeito apresenta um índice de tolerância alto e a maior biomassa da plântula, possivelmente pode ser explicada pela menor absorção de Fe e Mn, o que sugere que o tratamento com essa molécula promove um dos mecanismo de evitação desses metais (GUPTA et al., 2019).

As plântulas de ipê-rosa provenientes do pré-condicionamento com NO não apresentaram prejuízo no crescimento mesmo acumulando concentrações potencialmente fitotóxicas de Fe e Mn. Mesmo tendo um atraso na germinação, os tratamentos de *priming* no solo conseguiram manter um crescimento comparado com o controle, no rejeito mesmo

apresentando redução do comprimento e atraso no aparecimento do segundo par de folhas. Entretanto, como visto por Cruz *et al.*, (2020), isso se dá pela falta de nutrientes e de matéria orgânica presentes em muitos rejeitos de mineradora de ferro e também pela compactação desses rejeitos (CLARK *et al.*, 2003). A raiz é o primeiro órgão a ter o contato e sentir os efeitos de altas concentrações de Fe, limitando o seu crescimento (ONAGA *et al.*, 2016). Contudo, o *priming* com NO e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> proporcionaram um aumento no crescimento radicular, pois essas moléculas estão relacionadas com o desenvolvimento da raiz principal (GUPTA *et al.*, 2019).

O teor maior de clorofilas nas plântulas do tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em solo neste trabalho, também foi relatado em plântulas de graviola cujas sementes foram embebidas em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (VELOSO *et al.*, 2020). Entretanto, ainda não está claro como esta molécula influencia no aumento dos pigmentos fotossintetizantes. Por outro lado, nos tratamentos de *priming* em sementes cujas plântulas foram cultivadas no rejeito, com o excesso de Fe e Mn, já foi relatada diminuição de clorofilas e carotenoides e conseqüentemente redução do processo fotossintético (LI *et al.*, 2019 e XUE *et al.*, 2018). Essas discrepâncias podem estar relacionadas aos níveis de Fe e Mn absorvidos e da tolerância inerente à cada espécie a estes metais. Neste trabalho, a redução destes pigmentos não afetou significativamente a fotossíntese, conforme se verificou pelos valores de Fv/Fm e ΦPSII, ETR e NPQ. Entretanto, de acordo com alguns autores (PEÑA-OLMOS & CASIERRA-POSADA, 2013 E LIN & JIN, 2018), a ETR e Fv/Fm podem diminuir drasticamente sob maior teor de Fe e de outros metais como o Mn, o que resulta em atividades fotossintéticas mais baixas. O dano ao PSII pode ocorrer devido à incapacidade na transferência de energia de excitação da antena para o centro de reação (BAKER & ROSENQVIST, 2004), limitando a dissipação não fotoquímica em função dos danos oxidativos causados pelo excesso de Fe (PINTO *et al.*, 2016). Mas nesse caso observamos que o aumento do NPQ com o condicionante de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, se dá pelo aumento de clorofilas associadas com o complexo antena, promovendo uma fotoproteção dissipando esse excesso de energia. Sabe-se que reduzindo o complexo antena das clorofilas o tamanho das antenas de clorofila, reduz o desperdício de energia por meio do NPQ e melhorando a eficiência de conversão de energia solar (GU *et al.*, 2017).

Para as enzimas do sistema antioxidante, observa-se resposta similar em relação à APX encontrado nas sementes no tratamento com NO+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no solo conforme descrito por Corpas *et al.*, (2015 e 2017). Contudo, nesse condicionante no rejeito vemos uma atividade inversa, do que foi descrita por estes autores, devido à presença de Fe e Mn. No condicionante com NO no rejeito foi verificada alta atividade de SOD e CAT, o que pode ser

explicado como uma resposta compensatória pelo acúmulo de metais (CARGNELUTTI et al., 2006). Estudos mostram que o nitroprussiato de sódio, como doador de NO, tem um efeito protetor aumentando a atividade de SOD e CAT (KUMARI et al., 2010), garantindo uma ação eficaz da atividade para manter sob controle os níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Em altas concentrações de Fe e outros metais, já foi relatado que o conteúdo de proteínas solúveis diminui enquanto aumenta o conteúdo de aminoácidos livres (MEHRABAN et al., 2008 e SENEVIRATNE, et al., 2017). Neste trabalho, o acúmulo de prolina presente em plântulas de ipê-rosa não foi diferente nos substratos. Contudo, no tratamento com NO há uma redução desse aminoácido em ambos os substratos, e até o momento não se tem indícios de uma via de interação entre o NO e prolina. A prolina é uma molécula osmoprotetora, em resposta a estresses pode ocorrer o seu acúmulo ou a sua redução (VERBRUGGEN & HERMANS 2008), o que mostra a sua atuação no sistema antioxidante não enzimático (KAUR & ASTHIR, 2015).

Tem sido relatado que o teor de açúcares solúveis tende a uma diminuição com o excesso de Fe e outros metais, o que está relacionado à menor taxa fotossintética (ONYANGO et al., 2019). Entretanto, como não houve danos no processo fotossintético, o conteúdo de açúcares solúveis, redutores e não redutores mantiveram-se similares independente ou não da presença de metais nas plântulas cultivadas no solo e no rejeito de mineração de ferro.

## 6. Conclusão e perspectivas

As sementes pré-condicionadas em rejeito apresentaram um atraso na germinação e uma baixa taxa de germinação, contudo mantiveram as atividades do sistema antioxidante enzimático prevenindo danos oxidativos. As plântulas provenientes do pré-condicionamento apresentaram um eficiente estabelecimento no rejeito, demonstrando um atraso no crescimento e não apresentaram danos no aparato fotossintético. As plântulas provenientes do *priming* com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> apresentaram o maior índice de tolerância, devido ao fato de não acumularem os metais. As plântulas provenientes do *priming* com NO, cultivadas em rejeito mostraram um maior acúmulo de Fe e Mn, maior eficiência de remoção, maior atividade do sistema enzimático antioxidante e não apresentaram danos no sistema fotossintético. Conclui-

se que o *priming* de sementes com diferentes moléculas sinalizadoras promovem vieses distintos em plântulas de ipê-rosa. Quando tratadas com o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, as plântulas provenientes desse *priming* apresentaram mecanismos de evitação à absorção de Fe e Mn presentes no rejeito de mineração de ferro. Com mais estudos, a técnica do *priming* poderá ser utilizada em práticas de restauração da cobertura vegetal de locais degradados pela atividade mineradora. Por outro lado, as plântulas provenientes do *priming* com NO, mostraram um mecanismo de tolerância ao Fe e Mn, e com estudos futuros esse conhecimento poderá ser utilizado em técnicas de fitorremediação desses locais contaminados por excesso de ferro e manganês.

## REFERÊNCIAS

- ADHIKARY, S.P, Sustainable management of mining area through phytoremediation: an overview, **Int J Curr Microbiol App Sci** 4:745–751, 2015.
- ADREES, M., ALI, S., RIZWAN, M., IBRAHIM, M., ABBAS, F., FARID, M., et al. The effect of excess copper on growth and physiology of important food crops: A review. 2015.
- ANDERSON, M. D.; PRASAD, T. K.; STEWART, C. R. Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase, and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotyls of maize seedlings. **Plant physiology**, v. 109, n. 4, p. 1247-1257, 1995.
- ANDRESEN, E.; PEITER, E.; KÜPPER, H. Trace metal metabolism in plants. **Journal Of Experimental Botany**, [S.L.], v. 69, n. 5, p. 909-954, 13 fev. 2018.
- ANICETO, A. F. B.; IKEDA-CASTRILLON, S. K.; FERNANDEZ, J. R.C.; MARTINS, B. A. A.; DUARTE, Í. S.; MORAIS, F. F. Avaliação de técnicas de semeadura direta e da transposição de serapilheira para a emergência e estabelecimento da Manduvi (*Sterculia apetala* (jacq). Karts.) em trabalho de restauração ecológica numa área de nascentes degradadas no Pantanal Mato-grossense. **Research, Society And Development**, [S.L.], v. 10, n. 2, p. 1-16, 3 fev. 2021.
- ANJUM, N. A.; SOFO, A.; SCOPA, A.; ROYCHOUDHURY, A.; GILL, S. S.; IQBAL, M., et al. Lipids and proteins-major targets of oxidative modifications in abiotic stressed plants. **Environ. Sci. Pollut. Res.** 22 4099–4121. 10.1007/s11356-014-3917-1, 2015
- ALMEIDA, V. G.; MOURA, E. N.; VIEIRA, G. T. Espécies vegetais utilizadas em áreas degradadas pela mineração. **Research, Society And Development**, [s.l.], v. 8, n. 3, p.1-15, 1 jan. 2019.
- ARASIMOWICZ-JELONEK, M.; FLORYSZAK-WIECZOREK, J.; GWÓŹDŹ, E. A. The message of nitric oxide in cadmium challenged plants. **Plant Sci** 181:612–620. 2011.
- ARMADA, C. A. S. Os desastres ambientais de Mariana e Brumadinho em face ao estado socioambiental brasileiro. **Territorium**, [S.L.], n. 28, p. 13-22, 15 dez. 2020.

ASHRAF, M.; FOOLAD, M, R. Pre-sowing seed treatment-a shotgun approach to improve germination, plant growth, and crop yield under saline and non-saline conditions. **Adv Agron**; 88: 223-71. 2005.

AUGUSTO, O. (2018). Brasil tem 45 barragens que correm risco de romper a qualquer momento. *Correio Braziliense*. Brasília, 20 nov. 2018. Disponível em: <https://www.correio braziliense.com.br/app/noticia/brasil/2018/11/20/interna-brasil,720359/brasil-tem-45-barragens-que-correm-risco-de-romper-a-qualquer-momento.shtml>. Acesso em: 17 maio. 2021.

AZEREDO, G, A; PAULA, R, C; VALERIS, V. GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE *Piptadenia moniliformis* Benth. SOB ESTRESSE HÍDRICO. **Ciência Florestal**, [s.l.], v. 26, n. 1, p.193-202, 31 mar. 2016. Universidad Federal de Santa Maria. <http://dx.doi.org/10.5902/1980509821112>.

AZEVEDO-NETO, A. D.; PRISCO, J. T.; ENEAS-FILHO, J.; MEDEIROS, J. V. R.; GOMES-FILHO, E. Hydrogen peroxide pre-treatment induces salt stress acclimation in maize plants. **J. Plant Physiol.** 162 1114–1122. 10.1016/j.jplph.2005.01.007, 2005.

BAILLY, C. Active oxygen species and antioxidants in seed biology. *Seed Sci. Res.* 14 93–107. 10.1079/SSR2004159, 2004.

BAILLY, C.; EL-MAAROUF-BOUTEAU, H.; CORBINEAU, F. From intracellular signaling networks to cell death: the dual role of reactive oxygen species in seed physiology. **Comptes Rendus Biologies**, [s.l.], v. 331, n. 10, p.806-814, out. 2008.

BAKER, N. R.; & ROSENQVIST, E. Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. **Journal of Experimental Botany**, 55(403), 1607– 1621. 2004.

BANERJEE, R.; GOSWAMI, P.; MUKHERJEE, A. Stabilization of Iron Ore Mine Spoil Dump Sites With Vetiver System. **Bio-geotechnologies For Mine Site Rehabilitation**, [s.l.], p.393-413, 2018.

BARBA-ESPIÑ, G.; DIAZ; V. P.; JOB, D.; BELGHAZI, M.; JOB, C.; HERNÁNDEZ, J. A. Understanding the role of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> during pea seed germination: a combined proteomic and hormone profiling approach. **Plant Cell Environ.** 2011

BARCELO, J.; & POSCHENRIEDER, C. Plant water relations as affected by heavy metal stress: A review. **Journal of Plant Nutrition**, 13(1), 1–37. 1990.

BASZYN'SKI, T. Interference of Cd<sup>2+</sup> in functioning of the photosynthetic apparatus of higher plants. **Acta Societatis Botanicorum Poloniae**, 55(2), 291–304. 2014.

BECKERS, G. J. M.; CONRATH, U. Priming for stress resistance: from the lab to the field. *Curr. Opin. Plant Biol.* 10 1–7. 10.1016/j.pbi.2007.06.002. 2007.

BECKER, M.; ASCH, F. Iron toxicity in rice—conditions and management concepts. **Journal of Plant Nutrition and Soil Sciences** 168, 558–573. 2005

BEWLEY, J. D.; BRADFORD, K.J.; HILHORST, H.W.M.; NONOGAKI H. Seeds physiology of development. In: Germination and dormancy. 3rd ed. New York: Springer; 2013.

BHATTACHARJEE, S. An inductive pulse of hydrogen peroxide pretreatment restores redox- homeostasis and mitigates oxidative membrane damage under extremes of temperature in two rice cultivars (*Oryza sativa* L., Cultivars Ratna and SR 26B). **Plant Growth Regul.** 68 395–410. 10.1007/s10725-012-9728-9, 2012

BORGES, A. A., JIMÉNEZ-ARIAS, D.; EXPÓSITO-RODRÍGUEZ, M.; SANDALIO, L. M.; PÉREZ, J. A. Priming crops against biotic and abiotic stresses: MSB as a tool for studying mechanisms. **Front. Plant Sci.** 5:642 10.3389/fpls.2014.00642. 2014

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye-binding. **Anal. Biochem.** 72:248-254. 1976.

BRADSHAW, A. D.; HUMPHREYS, M. O.; JOHNSON, M. S. The value of heavy metal tolerance in the revegetation of metalliferous mine wastes. In Goodman GT, Chadwick MJ, editors: **Environmental management of mineral wastes**, The Netherlands, pp 311–314. 1978.

BRASIL, **Ministério da Indústria, Comércio Exterior e Serviços**, 2020. Disponível em: <<http://www.mdic.gov.br/comercio-exterior/estatisticas-de-comercio-exterior/comercio-vis/frame-uf-produto?uf=mg>>. Acesso em: 30 de janeiro de 2020.

BRASIL. **Constituição da República Federativa do Brasil de 1988**: Artigo 225. Brasília: Presidência da República, 1988. Disponível em: <<http://www.planalto.gov.br>>. Acesso em: 06 abril. 2019.

BRASIL. Decreto nº 97.632 de 10 de abril de 1989. Dispõe sobre a regulamentação do Artigo 2º, inciso VIII, da Lei nº 6.938, de 31 de agosto de 1981, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, 12 abr. 1989. Disponível em: <<http://www.planalto.gov.br>>. Acesso em: 06 abril. 2019.

BRUCE, T. J. A.; MATTHES, M. C.; NAPIER, J. A.; & PICKETT, J. A. Stressful “memories” of plants: Evidence and possible mechanisms. **Plant Science**, 173(6), 603–608.doi:10.1016/j.plantsci.2007.09.002. 2007.

CARGNELUTTI, D.; TABALDI, L. A.; SPANEVELLO, R. M.; JUCOSKI, G. O.; BATTISTI, V.; REDIN, M., LINARES, C. E. B.; DRESSLER, V. L.; FLORES, E. M. M.; NICOLOSO, F.T.; MORSCH, V. M.; SCHETINGER, M. R. C. Mercury toxicity induces oxidative stress in growing cucumber seedlings. **Chemosphere**. 65: 999-1006. 2006.

CARMO, F. F.; KAMINO, L. H. Y.; JUNIOR, R. T.; DE CAMPOS, I. C.; DO CARMO, F. F.; SILVINO, G.; & PINTO, C. E. F. Fundão tailings dam failures: the environment tragedy of the largest technological disaster of Brazilian mining in global context. *Perspectives in Ecology and Conservation*. 2017.

CAVA, M. G. B.; ISERNHAGEN, I.; MENDONÇA, A. H.; & DURIGAN, G. Comparação de técnicas para restauração da vegetação lenhosa de Cerrado em pastagens abandonadas. **Hoehnea**, 43 (2), 301-315. <http://dx.doi.org/10.1590/2236-8906-18>. 2016.

CHAO, Y. Y.; HSU, Y. T.; KAO, C. H. Involvement of glutathione in heat shock-and hydrogen peroxide-induced cadmium tolerance of rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. **Plant Soil** 318 37–45. 10.1007/s11104-008-9815-x. 2009.

CI, D.; JIANG, D.; DAI, T.; JING, Q.; & CAO, W. Variation in Cadmium Tolerance and Accumulation and Their Relationship in Wheat Recombinant Inbred Lines at Seedling Stage. **Biological Trace Element Research**, 142(3), 807–818. 2010

CLARK, L.J.; WHALLEY, W.R.; BARRACLOUGH, P.B. How do roots penetrate strong soil? In: Abe, J. (Ed.), *Roots: the Dynamic Interface between Plants and the Earth. Developments in Plant and Soil Sciences*. Springer, Dordrecht, pp. 93–104.2003

CORPAS, F. J.; LETERRIER, M.; VALDERREMA, R.; AIRAKI, M.; CHAKI, M.; PALMA, J. M.; BARROSO J, B. Nitric oxide imbalance provokes a nitrosative response in plants under abiotic stress. **Plant Sci** 181:604–611, 2011.

CORPAS, F. J.; GUPTA, D. K.; PALMA, J. M. Production sites of reactive oxygen species (ROS) in organelles from plant cells. In: **Gupta DK, Palma JM, Corpas FJ (eds) Reactive oxygen species and oxidative damage in plants under stress. Springer, Cham, pp 1–22. 2015.**

CORPAS, F. J.; BARROSO, J. B.; PALMA, J. M.; RODRÍGUEZ-RUIZ, M. Plant peroxisomes: a nitro-oxidative cocktail. **Redox Biol** 11:535–542. 2017.

CRUZ, F. V. DA S.; GOMES, M. P.; BICALHO, E. M.; DELLA TORRE, F.; & GARCIA, Q. S. Does Samarco’s spilled mud impair the growth of native trees of the Atlantic Rainforest? **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 189, 2020.

DAT, J.; VANDENABEELE, S.; VRANOVÁ, E.; VAN MONTAGU, M.; INZÉ, D; VAN BREUSEGEM, F. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. **Cell Mol. Life Sci.** 57 779–795. 10.1007/s000180050041, 2000.

DESHMUKH, D. K.; TSAI, Y. I.; DEB, M. K.; ZARMPAS, P. Characteristics and sources of water-soluble ionic species associated with PM10 particles in the ambient air of central India. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.** 89 (5), 1091–1097. 2012

DURSUN, A.; EKINCI, M. Effects of different priming treatments and priming durations on germination percentage of parsley (*Petroselinum crispum* L.) seeds. **Agric Sci**; 1: 17-23. 2010.

EDERLI, L.; REALE, L.; MADEO, L.; FERRANTI, F; GEHRING, C.; FORNACIARI, M.; PASQUALINI, S. NO release by nitric oxide donors in vitro and in planta. **Plant Physiology and Biochemistry**, 47(1), 42–48. doi:10.1016/j.plaphy.2008.09.008. 2009.

EGBICHI, I.; KEYSTER, M.; & LUDIDI, N. Effect of exogenous application of nitric oxide on salt stress responses of soybean. **South African Journal of Botany**, 90, 131–136. doi:10.1016/j.sajb.2013.11.002. 2014.

EL-JAOUAL, T.; COX, D. A. Manganese toxicity in plants. **Journal of Plant Nutrition** 21, 353–386. 1998.

EL-MAAROUF-BOUATEAU, H.; BAILLY C. Oxidative signaling in seed germination and dormancy. **Plant Signal. Behav.**, 2008.

- FAROOQ, M.; BASRA, S .M. A.; REHMAN, H.; AHMAD. N.; SALEEM ,B.A. Osmopriming improves the germination and early seedling growth of melons (*Cucumis melo* L.). **Pak J Agri Sci**; 44: 529-36. 2007
- FAROOQ, M.; BASRA, S.M.A.; WAHID, A.; AHMAD, N.; SALEEM, B.A. Improving the drought tolerance in rice (*Oryza sativa* L.) by exogenous application of salicylic acid. **J Agron Crop Sci** 195: 237- 46. 2009.
- FERNANDES, R.; BARRÓN, V.; TORRENT, J.; FONTES, M. Quantificação de óxidos de ferro em latossolos brasileiros por refletância difusa. **Revista Brasileira de Ciência do Solo** 28, 245–257. 2004.
- FILIPPOU, P.; TANOU, G.; MOLASSIOTIS, A.; FOTOPOULOS, V. Plant acclimation to environmental stress using priming agents, in: **Plant Acclimation to Environmental Stress** eds Tuteja N., Gill S. S., editors. (Berlin, NY: Springer Science & Business Media) 1–28, 2012.
- FONTAINE, O.; HUAULT, C.; PAVIS, N.; BILLARD, J. P. Dormancy breakage of *Hordeum vulgare* seeds: Effect of hydrogen peroxide and stratification on glutathione level and glutathione reductase activity. **Plant Physiol Biochem** ; 32:677- 83. 1994
- FOREMAN, J.; DEMIDCHIK, V.; BOTHWELL, J. H.; MYLONA P.; MIEDEMA, H.; TORRES, M. A. Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. **Nature** 422 442–446. 10.1038/nature01485, 2003.
- GAI, A. P. C.; DOS SANTOS, D. S.; & VIEIRA, E. A. Effects of zinc excess on antioxidant metabolism, mineral content and initial growth of *Handroanthus impetiginosus* (Mart. ex DC.) Mattos and *Tabebuia rosealba* (Ridl.) Sandwith. **Environmental and Experimental Botany**, 144, 88–99. 2017
- GAVASSI, M. A.; GAION, L. A.; MONTEIRO, C. C.; SANTOS, J. C.; & CARVALHO, R. F. Seed priming with sodium nitroprusside attenuates the effects of water deficit on soybean seedlings. **Comunicata Scientiae**, 10(1), 176-184. 2019.
- GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants. **Plant physiology**, v. 59, n. 2, p. 309-314, 1977.
- GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiol. Biochem.** 48 909–930. 10.1016/j.plaphy.2010.08.016. 2010.
- GIRI, G. S.; SCHILLINGER, W. F. Seed priming winter wheat for germination, emergence and yield. **Crop Sci**; 43: 2135-41. 2003.
- GOMES, M. P.; GARCIA, Q. S. Reactive oxygen species and seed germination. **Biologia (Poland)**, v. 68, n. 3, p. 351–357, 2014.
- GONDIM, F. A.; GOMES-FILHO, E.; COSTA, J. H.; ALENCAR, N. L. M.; PRISO, J. T. Catalase plays a key role in salt stress acclimation induced by hydrogen peroxide pretreatment in maize. **J. Plant Physiol. Biochem.** 56 62–71. 10.1016/j.plaphy.2012.04.012, 2012.
- GONDIM, F. A.; MIRANDA, R. S.; GOMES-FILHO, E.; PRISCO, J. T. Enhanced salt tolerance in maize plants induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> leaf spraying is associated with improved gas

- exchange rather than with non-enzymatic antioxidant system. **Theor. Exp. Plant Physiol.** 25 251–260. 10.1590/S2197-00252013000400003, 2013.
- GONG, M.; CHEN, B.; LI, Z. G.; GUO, L. H. Heat-shock-induced cross adaptation to heat, chilling, drought and salt stress in maize seedlings and involvement of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. **J. Plant Physiol.** 158112–1130. 10.1078/0176-1617-00327. 2001.
- GOVERNO DO ESTADO DE MINAS GERAIS. MINAS GERAIS. **Conheça Minas**. Disponível em: <GOVERNO DO ESTADO DE MINAS GERAIS>. Acesso em: 30 jan. 2020.
- GRAZIANO, M.; & LAMATTINA, L. Nitric oxide and iron in plants: an emerging and converging story. **Trends in Plant Science**, 10(1), 4–8. 2005.
- GU, J.; ZHOU, Z.; LI, Z.; CHEN, Y.; WANG, Z.; AND ZHANG, H. Rice (*Oryza sativa* L.) with reduced chlorophyll content exhibit higher photosynthetic rate and efficiency, improved canopy light distribution, and greater yields than normally pigmented plants. **Field Crops Res.** 200, 58–70. 2017.
- GUPTA, A.; DADLANI, M.; ARUN, K. M. B.; ROY, M.; NASEEM, M.; CHOUDHARY, V. K. et al. Seed priming: the aftermath. **Int J Agric Environ Biotechnol**; 1: 199-209. 2008
- GUPTA, K. J.; IGAMBERDIEV, A. U. The anoxic plant mitochondrion as a nitrite: NO reductase. **Mitochondrion** 11:537–543, 2011
- GUPTA, D. K.; PALMA, J. M.; CORPAS, F. J. (Eds.). *Nitric Oxide and Hydrogen Peroxide Signaling in Higher Plants*. doi:10.1007/978-3-030-11129-8, 2019.
- HALLIWELL, B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. **Plant Physiol.** 141 312–322. 10.1104/pp.106.077073, 2016.
- HASANUZZAMAN, M.; HOSSAIN, M. A.; FUJITA, M. Nitric oxide modulates antioxidant defense and the methylglyoxal detoxification system and reduces salinity-induced damage of wheat seedlings. **Plant Biotechnol. Rep.** 5 353–365. 10.1007/s11816-011-0189-9, 2011a.
- HASANUZZAMAN, M.; HOSSAIN, M. A.; FUJITA, M. Selenium-induced up-regulation of the antioxidant defense and methylglyoxal detoxification system reduces salinity-induced damage in rapeseed seedlings. **Biol. Trace Elem. Res.** 143 1704–1721. 10.1007/s12011-011-8958-4, 2011b.
- HEMALATHA, G.; RENUGADEVI, J.; EEVERA, T. Studies on Seed Priming with Hydrogen Peroxide for Mitigating Salt Stress in Rice. **International Journal Of Current Microbiology And Applied Sciences**, [S.L.], v. 6, n. 6, p. 691-695, 10 jun. 2017.
- HOSSAIN, M. A.; FUJITA M. Hydrogen peroxide priming stimulates drought tolerance in mustard (*Brassica juncea* L.). **Plant Gene Trait.** 4 109–123, 2013
- HOSSAIN, M. A.; MOSTOFA, M. G.; FUJITA, M. Cross protection by cold-shock to salinity and drought stress-induced oxidative stress in mustard (*Brassica campestris* L.) seedlings. **Mol. Plant Breed.** 4 50–70, 2013.
- HUSSAIN, HAFIZ ATHAR *et al.* Seed Priming Toward Enhanced Chilling Tolerance in Field Crops: an overview. **Priming And Pretreatment Of Seeds And Seedlings**, [S.L.], p. 265-286, 2019.

IBAMA. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, Ministério do Meio Ambiente. Diretoria de Proteção Ambiental e DIPRO e Coordenação Geral de Emergências Ambientais - CGEMA. Laudo Técnico Preliminar: Impactos ambientais decorrentes do desastre envolvendo o rompimento da barragem de Fundão, em Mariana, Minas Gerais, Novembro de 2015, p. 38. Acesso em: 17/01/2020. Disponível em: [http://www.ibama.gov.br/phocadownload/barragemdefundao/laudos/laudo\\_tecnico\\_preliminar\\_Ibama.pdf](http://www.ibama.gov.br/phocadownload/barragemdefundao/laudos/laudo_tecnico_preliminar_Ibama.pdf), 2015

ISHIBASHI, Y.; YAMAGUCHI, H.; YUASA, T.; INWAYA-INOUE, M.; ARIMA, S.; ZHENG, S. Hydrogen peroxide spraying alleviates drought stress in soybean plants. *J. Plant Physiol.* 168 1562–1567. 10.1016/j.jplph.2011.02.003, 2011.

IZMAIŁOW, R.; KOŚCIŃSKA-PAJAŁ, M.; KWIATKOWSKA, M.; MUSIAŁ, K. Effect of heavy metals on reproduction in plants. In: WIERZBICKA M (ed) **Ecotoxicology: plants, soils, metals**: monograph. Wydawnictwa Uniwersytetu Warszawskiego, Warszawa, pp 96–116. 2015.

JORGE, R. A. B.; ABREU, C. A.; ANDRADE, C. A.; CAMARGO, O. A. Filter cake and peat as amendments of contaminated soil with residue of scrap rich in boron. *Bragantia* 69, 467-476. 2010.

KARMOUS, I.; BELLANI, L. M.; CHAOUI, A.; EL FERJANI, E.; & MUCCIFORA, S. Effects of copper on reserve mobilization in embryo of *Phaseolus vulgaris* L. **Environmental Science and Pollution Research**, 22(13), 10159–10165. 2015.

KAUR, G.; ASTHIR, B. Proline: a key player in plant abiotic stress tolerance. **Biol Plant**. 2015.

KHAN, H. A.; AYUB, C. M.; PERVEZ, M. A.; BILAL, R. M; SHAHID, M. A.; ZIAF, K. Effect of seed priming with NaCl on salinity tolerance of hot pepper (*Capsicum annuum* L.) at seedling stage. **Soil Environ**; 28: 81-7. 2009a.

KHAN, H. A.; PERVEZ, M. A.; AYUB, C. M; ZIAF, K; BILAL, R. M; SHAHID, M. A. et al. Hormonal priming alleviates salt stress in hot pepper (*Capsicum annuum* L.). **Soil Environ**; 28: 130-5. 2009b.

KORKMAZ, A. Inclusion of acetyl salicylic acid and methyl jasmonate into the priming solution improves low-temperature germination and emergence of sweet pepper. **HortScience**; 40: 197-200. 2005.

KORSHUNOVA, Y. O.; EIDE, D.; CLARK, W. G.; GUERINOT, M. L.; PAKRASI, H. B. The IRT1 protein from *Arabidopsis thaliana* is a metal transporter with a broad substrate range. **Plant Molecular Biology** 40, 37–44. 1999.

KUMARI, A.; SHEOKAND, S.; SWARAJ, K. Nitric oxide induced alleviation of toxic effects of short term and long term Cd stress on growth, oxidative metabolism and Cd accumulation in Chickpea. **Brazilian Journal Of Plant Physiology**, [S.L.], v. 22, n. 4, p. 271-284, 2010.

KÜPPER, H. Lead toxicity in plants. In: Sigel A, Sigel H, Sigel RKO, eds. Lead: its effects on environment and health. Berlin: Walter de Gruyter, GmbH, 491–500. 2017.

LI, B.; SUN, L.; HUANG, J.; GÖSCHL, C.; SHI, W.; CHORY, J.; et al. GSNOR provides plant tolerance to Fe toxicity via preventing iron-dependent nitrosative and oxidative cytotoxicity. **Nature Communications**, 10(1), 1–13.2019

LICHTENTHALER, H. K.; & BUSCHMANN, C. Chlorophylls and Carotenoids: Measurement and Characterization by UV-VIS Spectroscopy. **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**, 1(1), F4.3.1–F4.3.8. doi:10.1002/0471142913.faf0403s01, 2001.

LIU, Z. J.; GUO, Y. K.; BAI, J. G. Exogenous hydrogen peroxide changes antioxidant enzyme activity and protects ultrastructure in leaves of two cucumber ecotypes under osmotic stress. **J. Plant Growth Regul.** 29 171–183. 10.1007/s00344-009-9121-8, 2010.

LINDERMAYR, C. Crosstalk between reactive oxygen species and nitric oxide in plants: key role of S-nitrosoglutathione reductase. **Free Radic Biol Med** 122:110–115. 2018.

LEUNG, D. W. M. Participation of Hydrogen Peroxide and Nitric Oxide in Improvement of Seed Germination Performance Under Unfavourable Conditions. **Nitric Oxide and Hydrogen Peroxide Signaling in Higher Plants**, 145–156. doi:10.1007/978-3-030-11129-8\_7. 2019.

LUBBEN, S.; SAUERBECK, D. The uptake and distribution of heavy metals by spring wheat. **Water, Air and Soil Pollution**, v.57-58, p.239-247, 1991.

LUTTS, S.; BENINCASA, P.; WOJTYLA, L.; KUBALA, S.; PACE, R.; LECHOWSKA; QUINET, M.; GARNCZARSKA, M. Seed Priming: New Comprehensive Approaches for an Old Empirical Technique. **In New Challenges in Seed Biology—Basic and Translational Research Driving Seed Technology**; Araujo, S., Balestrazzi, A., Eds.; **InTech**: Daimlerstraße, Germany; ISBN 978-953-51-2658-4. 2016.

MAGUIRE, J. D. Speed of germination aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, Madison, v. 2, n. 2, p.176-77, 1962.

MAHESHWARI, R.; & DUBEY, R. S. Inhibition of ribonuclease and protease activities in germinating rice seeds exposed to nickel. **Acta Physiologiae Plantarum**, 30(6), 863–872. 2008.

MARTINS, C. C.; NAKAGAWA, J.; BOVI, M. L. A. Efeito da posição da semente no substrato e no crescimento inicial das plântulas de palmito vermelho (*Euterpe espirotosantensis* Fernandes – Palmae). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 21, n. 1, p. 164-173, 1999.

MALCOVÁ, R.; ALBRECHTOVÁ, J.; VOSÁTKA, M. The role of the extraradical mycelium network of arbuscular mycorrhizal fungi on the establishment and growth of *Calamagrostis epigejos* in industrial waste substrates. **Applied Soil Ecology**, 18 (2), 129, 2001.

MCDONALD, M. B. Seed Priming. In: Black M, Bewley JD, editors. *Seed Technology and Its Biological Basis*. Sheffield, **England: Sheffield Academic Press**. p 287-325. 2000.

MEHRABAN, P.; ZADEH, A. A, & Sadeghipour, H. R. Iron toxicity in rice (*Oryza sativa* L.), under different potassium nutrition. **Asian Journal of Plant Sciences**, 7(3), 251–259. 2008.

MISHRA, S.; & DUBEY, R. S. Inhibition of ribonuclease and protease activities in arsenic exposed rice seedlings: Role of proline as enzyme protectant. **Journal of Plant Physiology**, 163(9), 927–936. 2006

MISHRA, S.; JHA, A.; & DUBEY, R. Arsenite treatment induces oxidative stress, upregulates antioxidant system, and causes phytochelatin synthesis in rice seedlings. **Protoplasma**, 248(3), 565–577. 2011.

MECHI, A.; SANCHES, D. L. Impactos ambientais da mineração no Estado de São Paulo. **Estudos Avançados**, v. 24, n. 68, pp. 209-220, 2010.

MORRIS, H. D.; AND PIERRE, W. H. Minimum concentrations of manganese necessary for injury to various legumes in culture solutions. **Agron. J.**, 41: 107–112. 1949.

MOSTOFA, M. G.; SERAJ, Z. I.; FUJITA, M. 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. 10.1007/s00709-014-0639-7, 2014a.

MOSTOFA, M. G.; YOSHIDA, N.; FUJITA, M. Spermidine pretreatment enhances heat tolerance in rice seedlings through modulating antioxidative and glyoxalase systems. **Plant Growth Regul.** 73 31–44. 10.1007/s10725-013-9865-9, 2014b.

MOSTOFA, M. G.; HOSSAIN, M. A.; FUJITA, M. Trehalose pretreatment induces salt tolerance in rice seedlings: oxidative damage and co-induction of antioxidant defense and glyoxalase systems. **Protoplasma** 252 461–475. 10.1007/s00709-014-0691-3. 2014c.

MOSTOFA, M. G.; FUJITA, M. Salicylic acid alleviates copper toxicity in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings by up-regulating antioxidative and glyoxalase systems. **Ecotoxicology** 22 959–973. 10.1007/s10646-013-1073-x, 2013.

MOURA, D. J. Recuperação De Áreas Degradadas Pela Mineração. Universidade Estadual de Goiás, Unidade Niquelândia 2015.

MYERS, N.; MITTERMEIER, R. A.; MITTERMEIER, C. G.; DA FONSECA, G. A. B.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, 403(6772), 853–858. doi:10.1038/35002501, 2000.

NAHAR, K.; HASANUZZAMAN, M.; ALAM, M. M.; FUJITA, M. Exogenous glutathione confers high temperature stress tolerance in mung bean (*Vigna radiata* L.) by modulating antioxidant defense and methylglyoxal detoxification system. **Environ. Exp. Bot.** 112 44–54. 2014.

NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant and cell physiology**, v. 22, n. 5, p. 867-880, 1981.

NICOLÁS, J.; CHIARI, M.; CRESPO, J.; ORELLANA, I. G.; LUCARELLI, F.; NAVA, S. Quantification of Saharan and local dust impact in an arid Mediterranean area by the positive matrix factorization (PMF) technique. **Atmos. Environ.** 42 (39), 8872–8882. 2008.

NONOGAKI, H. Seed dormancy and germination-emerging mechanisms and new hypotheses. **Front Plant Sci** 5:233, 2014.

NONOGAKI, H. Seed biology updates-highlights and new discoveries in seed dormancy and germination research. *Front Plant Sci* 8:524, 2017.

ONAGA, G.; DRAMÉ, K. N.; ISMAIL, A. M. Understanding the regulation of iron nutrition: can it contribute to improving iron toxicity tolerance in rice? **Functional Plant Biology** 43: 709–726. 2016.

ONYANGO, D. A.; ENTILA, F.; DIDA, M. M.; ISMAIL, A. M.; & DRAME, K. N. Mechanistic understanding of Fe toxicity tolerance in contrasting rice varieties from Africa: 1. Morpho-physiological and biochemical responses. **Functional Plant Biology**, 46(1), 93– 105. 2019.

PATADE, V. Y.; SUJATA, B.; SUPRASANNA, P. Halopriming imparts tolerance to salt and PEG induced drought stress in sugarcane. **Agric Ecosyst Environ**; 134: 24-28. 2009.

PAWAR, V. A.; LAWARE, S. L. Seed Priming A Critical Review. **International Journal Of Scientific Research In Biological Sciences**, [S.L.], v. 5, n. 5, p. 94-101, 31 out. 2018.

PEÑA-OLMOS, J. E.; & CASIERRA-POSADA, F. Photochemical efficiency of photosystem II (PSII) in broccoli plants (*Brassica oleracea* var *Italica*) affected by excess iron. **Orinoquia**, 17(1), 15– 22. 2013.

PERFUS-BARBEOCH, L.; LEONHARDT, N.; VAVASSEUR, A.; & FORESTIER, C. Heavy metal toxicity: Cadmium permeates through calcium channels and disturbs the plant water status. **The Plant Journal**, 32(4), 539–548. 2002.

PINTO, S. D. S.; SOUZA, A. E. D.; OLIVA, M. A.; & PEREIRA, E. G. Oxidative damage and photosynthetic impairment in tropical rice cultivars upon exposure to excess iron. **Scientia Agricola**, 73(3), 217-226. 2016.

PRASAD, M.; & STRZĄŁKA, K. Impact of heavy metals on photosynthesis. In M. N. V. Prasad & J. Hagemeyer (Eds.), *Heavy metal stress in plants* (pp. 117–138). Berlin: **Springer**. 1999.

RAHMAN, M. M.; AZIRUN, S. M.; BOYCE, A. N. Enhanced Accumulation of Copper and Lead in Amaranth (*Amaranthus paniculatus*), Indian Mustard (*Brassica juncea*) and Sunflower (*Helianthus annuus*). **PLOS ONE** 8, e 62941. 2013.

RAMIREZ, L.; ZABALETA, E. J.; LAMATTINA, L. Nitric oxide and frataxin: two players contributing to maintain cellular iron homeostasis. **Ann Bot.** 2010.

RAUPP, P. P.; FERREIRA, M. C.; ALVES, M.; CAMPOS-FILHO, E. M.; SARTORELLI, P. A. R.; CONSOLARO, H. N.; & VIEIRA, D. L. M. Direct seeding reduces the costs of tree planting for forest and savana restoration. **Ecological Engineering**, 148, 105788. 2020.

REITZ, R.; KLEIN, R. M.; REIS, A. Projeto Madeira do Rio Grande do Sul. *Sellowia*, Itajaí, n. 34 e 35, p.1-525, 1983.

RHOADS, D. M.; UMBACH, A. L.; SUBBIAH, C. C.; SIEDOW, J. N. Mitochondrial reactive oxygen species. Contribution to oxidative stress and interorganellar signaling. **Plant Physiol.** 141 357–366, 2006.

RIOS, C. O. et al. Assessment of Iron Toxicity in Tropical Grasses with Potential for Revegetating Mined Areas. **Polish Journal Of Environmental Studies**, [s.l.], v. 26, n. 5, p.2167-2173, HARD Publishing Company. <http://dx.doi.org/10.15244/pjoes/68429>, 2017.

RODRIGUES, R. R.; LIMA, R. A. F.; GANDOLFI, S.; NAVE, A. G. On the restoration of high diversity forests: 30 years of experience in the Brazilian Atlantic Forest. **Biological Conservation**, v. 142, p. 1242-1251, 2009.

RODRIGUES, A. B. M.; GIULIATTI, N. M.; & JÚNIOR, A. P. Aplicação de metodologias de recuperação de áreas degradadas nos biomas brasileiros. **Brazilian Applied Science Review**, 4 (1), 333-369. 2020.

SAHAY, S.; GUPTA, M. An update on nitric oxide and its benign role in plant responses under metal stress. *Nitric Oxide* 67:39–52, 2017

SAMI, F.; FAIZAN, M.; FARAZ, A.; SIDDIQUI, F.; YUSUF, M.; HAYAT, S. Nitric oxide-mediated integrative alterations in plant metabolism to confer abiotic stress tolerance, NO crosstalk with phytohormones and NO-mediated post translational modifications in modulating diverse plant stress. *Nitric Oxide* 73:22–38, 2018.

SATHIYARAJ, G.; SRINIVASAN, S.; KIM, Y. J.; LEE, O. R.; BALUSAMY, S. D. R.; KHOROLARAGCHAA, A. Acclimation of hydrogen peroxide enhances salt tolerance by activating defense-related proteins in *Panax ginseng* CA. Meyer. **Mol. Biol. Rep.** 41 3761–3771. 10.1007/s11033-014-3241-3, 2014.

SHARMA, A. D.; RATHORE, S. V. S.; SRINIVASAN, K.; TYAGI, R. K. Comparison of various seed priming methods for seed germination, seedling vigour and fruit yield in okra (*Abelmoschus esculentus* L. Moench). **Sci Horti**; 165: 75-81. 2014.

SINGH, N.; BHATLA, S.C. Nitric oxide regulates lateral root formation through modulation of ACC oxidase activity in sunflower seedlings under salt stress. **Plant Signal Behav** 25:1–7. 2018.

SENEVIRATNE, M.; RAJAKARUNA, N.; RIZWAN, M.; MADAWALA, H. M. S. P.; OK, Y. S.; & VITHANAGE, M. Heavy metal-induced oxidative stress on seed germination and seedling development: a critical review. **Environmental Geochemistry and Health**. doi:10.1007/s10653-017-0005-8. 2017.

SHAH, K.; & DUBEY, K. Effect of cadmium on RNA level as well as activity and molecular forms of ribonuclease in growing rice seedlings. **Plant Physiology and Biochemistry**, 33(5), 577–584. 1995.

SHAH, K.; & DUBEY, R. Cadmium elevates level of protein, amino acids and alters activity of proteolytic enzymes in germinating rice seeds. **Acta Physiologiae Plantarum**, 20(2), 189–196. 1998.

SHAH, K.; KUMAR, R. G.; VERMA, S.; & DUBEY, R. Effect of cadmium on lipid peroxidation, superoxide anion generation and activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings. **Plant Science**, 161(6), 1135–1144. 2001.

SILVA, G.P.; FONTES, M.P.F.; COSTA, L.M.; VENEGAS, V. H. A. Potencialidade de plantas para revegetação de estêreis e rejeito da mineração de ferro da mina de alegria, Mariana-MG. **Pesquisa Agropecuária Tropical** 36 (3), 165, 2006.

SINGH, O. P. Problems and remedies. In *Mining Environment*, OP Singh, (ed.). **Regency Publications**: New Delhi; 278– 279. 2005

SIQUEIRA-SILVA, A. I.; RIOS, C. O.; & PEREIRA, E. G. Iron toxicity resistance strategies in tropical grasses: The role of apoplastic radicular barriers **Journal of Environmental Sciences**. doi:10.1016/j.jes.2018.10.005. 2019.

SIVRITEPE, H.O.; SIVRITEPE, N.; ERIS, A.; TURHAN, E. The effects of NaCl pretreatments on salt tolerance of melons grown under long-term salinity. **Sci Hortic**; 106: 568-81. 2005.

SOEDA, Y.; KONINGS, M. C. J. M.; VORST, O.; VAN HOUWELINGEN, A. M. M. L.; STOOPEN, G. M.; MALIEPAARD, C. A.; et al. Gene expression programs during *Brassica oleracea* seed maturation, osmopriming, and germination are indicators of progression of the germination process and the stress tolerance level. **Plant Physiol**; 137: 354-68. 2005.

TANOOU, G.; FILIPPOU, P.; BELGHAZI, M.; DIAMANTIDIS, G.; FOTOPOULOS. V.; MOLASSIOTIS, A. Oxidative and nitrosative-based signaling and associated post-translational modifications orchestrate the acclimation of citrus plants to salinity stress. **Plant J**. 72 585–599. 10.1111/j.1365-313X.2012.05100.x. 2012.

TABASSUM, T.; AHMAD, R.; FAROOQ, M.; BASRA, S. M. A. Improving salt tolerance in barley by Osmopriming and biopriming. **Int J Agric Biol** 20:2455–2464. 2018.

TENG, K.; LI, J.; LIU, L.; HAN, Y.; DUM, Y.; ZHANG, J. Exogenous ABA induces drought tolerance in upland rice: the role of chloroplast and ABA biosynthesis-related gene expression on photosystem II during PEG stress. **Acta Physiol. Plant**. 36 2219–2227. 10.1007/s11738-014-1599-4, 2014.

TEWARI, R. K, HADACEK, F.; SASSMANN. S.; LANG, I. Iron deprivation induced reactive oxygen species generation leads to non-autolytic PCD in *Brassica napus* leaves. **Environmental and Experimental Botany** 91,74–83. 2013.

TSUKAGOSHI, H.; BUSCH, W.; BENFEY, P. N. Transcriptional regulation of ROS controls transition from proliferation to differentiation in the root. **Cell** 143 606–616. 10.1016/j.cell.2010.10.020, 2010.

UCHIDA, A.; JAGENDORF, A. T.; HIBINO, T.; TAKABE, T. Effects of hydrogen peroxide and nitric oxide on both salt and heat stress tolerance in rice. **Plant Sci**. 163 515–523. 10.1016/S0168-9452(02)00159-0, 2002.

VELIKOVA, V.; YORDANOV, I.; EDREVA, A. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants: protective role of exogenous polyamines. **Plant science**, v. 151, n. 1, p. 59-66, 2000.

VELOSO, L. L. DE S. A.; CAPITULINO, J. D.; SOARES DE LIMA, G.; VIEIRA DE AZEVEDO, C. A.; RODRIGUES DA SILVA, A. A.; & GHEYI, H. R. Methods of applying hydrogen peroxide to soursop seedlings irrigated with saline water. **Comunicata Scientiae**, 12, 2020.

- VERBRUGGEN, N.; HERMANS, C. Proline accumulation in plants: a review. *Amino Acids* 35:753–759. 2008.
- VERMA, S. R.; CHAUDHARI, P.R.; SATYANARANYAN, S. Impact of leaching from iron ore mines on terrestrial and aquatic environment. *Int. J. Environ. Sci.* 2, 2378–2386, 2012.
- WAHID, A.; PERVEEN, M.; GELANI, S.; BASRA, S. M. A. Pretreatment of seed with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> improves salt tolerance of wheat seedlings by alleviation of oxidative damage and expression of stress proteins. *J. Plant Physiol.* 164 283–294. 10.1016/j.jplph.2006.01.005, 2007.
- WANG, Y.; LI, J.; WANG, J.; LI, Z. Exogenous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> improves the chilling tolerance of manilagrass and mascarenegrass by activating the antioxidative system. *Plant Growth Regul.* 61:195–204. 10.1007/s10725-010-9470-0, 2010.
- WANG, Z.; CUSCHIERI, A. Tumour cell labelling by magnetic nanoparticles with determination of intracellular iron content and spatial distribution of the intracellular iron. *Int J Mol Sci* 14:9111–9125, 2013.
- XUE, S. G.; WANG, J.; WU, C.; LI, S.; HARTLEY, W.; WU, H.; ZHU, F.; CUI, M Q. Physiological response of *Polygonum perfoliatum* L. following exposure to elevated manganese concentrations. *Environ Sci Pollut Res* 25:132–140. 2018
- ZHENG, Y.; SHEN, L.; YU, M.; FAN, B.; ZHAO, D.; LIU, L.; SHENG, J. Nitric oxide synthase as a postharvest response in pathogen resistance of tomato fruit. *Postharvest Biol Technol* 60:38–46. 2011.