

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

Miriam da Silva Tavares

**EFEITOS DA INTERAÇÃO ENTRE FÓSFORO E EXCESSO DE FERRO
NAS CARACTERÍSTICAS MORFOMÉTRICAS E FISIOLÓGICAS DE
CULTIVARES DE ARROZ (*Oryza sativa* L.)**

Santa Maria, RS
2017

Miriam da Silva Tavares

**EFEITOS DA INTERAÇÃO ENTRE FÓSFORO E EXCESSO DE FERRO NAS
CARACTERÍSTICAS MORFOMÉTRICAS E FISIOLÓGICAS DE CULTIVARES DE
ARROZ (*Oryza sativa* L.)**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação
em Agronomia, da Universidade Federal de
Santa Maria (UFSM, RS), como requisito
parcial para obtenção do título de **Doutora
em Agronomia.**

Orientador: Prof. Dr. Fernando Teixeira Nicoloso

Santa Maria, RS

2017

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

da Silva Tavares, Miriam
EFEITOS DA INTERAÇÃO ENTRE FÓSFORO E EXCESSO DE FERRO
NAS CARACTERÍSTICAS MORFOMÉTRICAS E FISIOLÓGICAS DE
CULTIVARES DE ARROZ (*Oryza sativa* L.) / Miriam da Silva
Tavares.- 2017.

113 p.; 30 cm

Orientador: Fernando Teixeira Nicoloso
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-
Graduação em Agronomia, RS, 2017

1. Nutrição mineral. *Oryza sativa* L.. Mecanismos
fisiológicos. I. Teixeira Nicoloso, Fernando II. Título.

Miriam da Silva Tavares

**EFEITOS DA INTERAÇÃO ENTRE FÓSFORO E EXCESSO DE FERRO NAS
CARACTERÍSTICAS MORFOMÉTRICAS E FISIOLÓGICAS DE CULTIVARES DE
ARROZ (*Oryza sativa* L.)**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação
em Agronomia da Universidade Federal de
Santa Maria (UFSM, RS), como requisito
parcial para obtenção do título de **Doutora em
Agronomia.**

Aprovado em 26 de Junho de 2017

Fernando Teixeira Nicoloso, Prof. Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientador)

Sidnei Deuner, Dr. (UFPEL)

Janette Palma Fett, PhD (UFRGS)

Paulo Ademar Avelar Ferreira, Dr. (UFSM)

Felipe Klein Ricachenevsky, Dr. (UFSM)

Santa Maria, RS
2017

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais Antônio e Helena pelo amor e
apoio incondicional em todos os momentos.*

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, que sempre fez as coisas acontecerem no momento certo na minha vida assim como sempre será meu amparo e refúgio.

A Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, pela oportunidade de realização do curso de doutorado.

Agradeço ao Prof. Fernando Teixeira Nicoloso, pela orientação, ensinamentos e empenho na correção da tese.

Aqui também faço referência aos professores Paulo Ferreira, Gustavo Brunetto e João Marcelo pelas contribuições e conselhos sempre pertinentes durante a realização deste trabalho.

Aos colegas de laboratório, Darlene Sausen, Camila Costa, Camila Tarouco, Márcio Schorr, Aniélen Dutra, Ruzieli Sandri, Letícia Frizzo, Anderson Marques, Raíssa Schwalbert, Bianca Knebel, Júlia Farias agradeço pelo apoio e também pelos auxílios ao longo do curso.

Agradeço pela amizade e apoio de Michele, Wilza, Priscila e Lindamara que mesmo a distância sempre compartilharam alegrias e tristezas, sempre uma apoiando a outra. Também agradeço a Sônia, Jocélia, Gabriela e a família Rosi (Artêmio, Marlete e Laura) pelo incentivo durante a realização da tese.

Enfim, meus sinceros agradecimentos, a todos aqueles que, de uma forma ou de outra contribuíram para a execução deste trabalho.

RESUMO

EFEITOS DA INTERAÇÃO ENTRE FÓSFORO E EXCESSO DE FERRO NAS CARACTERÍSTICAS MORFOMÉTRICAS E FISIOLÓGICAS DE CULTIVARES DE ARROZ (*Oryza sativa* L.)

AUTORA: Miriam da Silva Tavares

ORIENTADOR: Fernando Teixeira Nicoloso

O ferro (Fe) é um micronutriente importante para vários processos fisiológicos das plantas. No entanto, a toxicidade de Fe é um problema que afeta muitas áreas de arroz cultivadas em ambientes de terras baixas. A interação antagonista entre Fe e fósforo (P) é um assunto de interesse considerável em ambientes inundados. As respostas de distintas cultivares a diferentes níveis de aproveitamento de P em condições de excesso de Fe, podem fornecer subsídios para uma maior tolerância e eficiência na absorção de nutrientes. Este trabalho teve por objetivo caracterizar os efeitos da nutrição fosfatada em cultivares de arroz submetidas à toxidez por Fe, identificando possíveis mecanismos de tolerância. Antes de estudar a interação do P e Fe no crescimento do arroz em solução nutritiva, três cultivares de arroz (Irga 425, Irga 424 e Br/Irga 409) foram cultivadas em diferentes concentrações de P (2,5, 15, 25 e 35mg L⁻¹) e de Fe (2, 100, 200 e 300mg L⁻¹) afim de verificar a variação das respostas das cultivares a parâmetros de crescimento de raízes e de parte aérea, bem como os parâmetros fotossintéticos. Verificou-se que as maiores respostas da taxa de assimilação líquida de CO₂ e eficiência de carboxilação da Rubisco foram obtidas nas concentrações de 15 e 25mg L⁻¹ de P. Os maiores danos morfológicos radiculares, a menor taxa de assimilação líquida de CO₂, eficiência de carboxilação da Rubisco e a menor produção de massa seca de parte aérea e de raiz foram observados nas concentrações de 200 e 300mg L⁻¹ de Fe. Diante dos resultados, foram selecionadas as concentrações de P (2,5, 15, 25mg L⁻¹) e de Fe (200mg L⁻¹) para obtenção de respostas morfológicas radiculares, nutricionais, fisiológicas e bioquímicas em cultivares de arroz. Em um experimento, as cultivares foram expostas ao excesso de Fe (200mg L⁻¹) combinado com as concentrações de P (2,5, 25mg L⁻¹) em solução nutritiva durante 15 e 22 dias. O excesso de Fe alterou a organização do centro quiescente, reduzindo número de células do meristema apical, refletindo em alterações no padrão de divisão celular. Com o aumento na concentração de P, em condições de excesso de Fe, a cultivar Irga 425 apresentou maior resposta dos parâmetros morfológicos radiculares (comprimento de raízes, área superficial e volume radicular), maior concentração de P no tecido de parte aérea e eficiência de absorção de P do que as cultivares Br/Irga 409 e Irga 424. Com exceção da concentração de Fe e manganês nos tecidos da parte aérea, o aumento na concentração de P na solução nutritiva, em condições de excesso de Fe, não influenciou na absorção de cobre e zinco. Em experimento utilizando areia como substrato, as cultivares foram submetidas a diferentes concentrações de Fe (2 e 200mg L⁻¹) combinadas com concentrações de P (2,5, 15mg L⁻¹) em solução nutritiva. No geral, todas as cultivares apresentaram algum grau de sensibilidade ao excesso de Fe, que causou comprometimento da taxa de assimilação líquida de CO₂, condutância estomática, reduções nas concentrações de clorofila, os quais refletiram em reduções no crescimento. A cultivar Irga 425 apresentou maior capacidade de utilização do P, em condições de toxidez de Fe, por meio de incrementos na atividade fotossintética e na atividade da superóxido dismutase.

Palavras chave: Nutrição mineral. *Oryza sativa* L.. Mecanismos fisiológicos.

ABSTRACT

EFFECTS FROM THE INTERACTION BETWEEN PHOSPHORUS AND EXCESS OF IRON IN THE MORPHOMETRIC AND PHYSIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF RICE CULTIVARS (*Oryza sativa* L.)

AUTHOR: Miriam da Silva Tavares

ADVISOR: Fernando Teixeira Nicoloso

Iron (Fe) is an important micronutrient for several physiological processes of plants. However, Fe toxicity is a problem that affects many areas of rice cultivated in lowland environments. The antagonistic interaction between Fe and phosphorus (P) is a subject of considerable interest in flooded environments. The responses of different cultivars to different levels of P utilization in conditions of excess Fe can provide new information for larger tolerance and efficiency in nutrient absorption. This work aimed to characterize the effects of phosphate nutrition on rice cultivars submitted to Fe toxicity, identifying possible mechanisms of tolerance. Before studying the interaction of P and Fe in the growth of rice in nutrient solution, three rice cultivars (Irga 425, Irga 424 and Br/Irga 409) were exposed at different concentrations of P (2,5, 15, 25 and 35mg L⁻¹) and Fe (2, 100, 200 and 300mg L⁻¹) in order to investigate the variation of the responses of the cultivars to the parameters of root and shoot growth, as well as the photosynthetic parameters. We found that the larger responses in the assimilation rate of CO₂ and Rubisco carboxylation efficiency were observed at concentrations of 15 and 25 mg L⁻¹ of P. The larger root morphometric damages, the lower assimilation rate of CO₂, Rubisco carboxylation efficiency and the lower dry mass of roots and shoots were observed at the concentrations of 200 and 300mg L⁻¹ of Fe. Were selected the concentrations of P (2,5, 15, 25mg L⁻¹) and Fe (200mg L⁻¹) to obtain root, nutritional, physiological and biochemical morphometric responses rice cultivars. In one experiment, the cultivars were exposed to excess Fe (200mg L⁻¹) combined with the two concentrations of P (2,5, 25mg L⁻¹) in nutrient solution, for 15 and 22 days. Fe excess altered the organization of the quiescent center, reflecting changes in the pattern of cell division. With the increase in P concentration under conditions of Fe excess, the cultivar Irga 425 presented higher root length, surface area and root volume, as well as higher of P concentration in the shoot tissue and absorption efficiency than the cultivars Br/Irga 409 and Irga 424. Except for the concentration of Fe and manganese in the tissues of the shoot, the increase in P concentration in the nutrient solution, under conditions of Fe excess, did not influence the absorption of copper and zinc. In another experiment, the cultivars were cultivated in pots having sand as substrate and twosand with distinct concentrations of Fe (2 e 200mg L⁻¹) combined with two concentrations of P (2,5, 15mg L⁻¹) in nutrient solution were tested, for 60 days. In general, all cultivars presented some degree of sensitivity to Fe excess, which caused impairment of the assimilation rate of CO₂, stomatal conductance, reductions in chlorophyll concentrations, which reflected in reductions in growth. The cultivar Irga 425 presented greater capacity of use of the P, in conditions of Fe toxicity, through increments in the photosynthetic activity and activity of superoxide dismutase.

Key words: Mineral nutrition. *Oryza sativa* L.. Physiological mechanisms.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1 – Dinâmica dos nutrientes em solos inundados..... | 17 |
| Manuscrito 1 | |
| Figura 1 – Taxa de assimilação líquida do CO ₂ [A] (A), eficiência de carboxilação da Rubisco [A/Ci] (B) e condutância estomática [Gs] (C) de três cultivares de arroz (Br/Irga 409, Irga 424 e Irga 425) cultivadas em diferentes concentrações de P em solução nutritiva..... | 37 |
| Figura 2 – Taxa de assimilação líquida do CO ₂ [A] (A), eficiência de carboxilação da Rubisco [A/Ci] (B) e condutância estomática [Gs] (C) de três cultivares de arroz (Br/Irga 409, Irga 424 e Irga 425) cultivadas em diferentes concentrações de Fe em solução nutritiva..... | 38 |
| Figura 3 – Comprimento radicular (A, D), área superficial radicular (B, E), volume radicular (C, F) e diâmetro radicular (G) de três cultivares de arroz (Br/Irga 409, Irga 424 e Irga 425) cultivadas em diferentes concentrações de P em solução nutritiva..... | 39 |
| Figura 4 – Comprimento radicular (A, E), área superficial radicular (B, F), volume radicular (C, G) e diâmetro radicular (D) de três cultivares de arroz (Br/Irga 409, Irga 424 e Irga 425) cultivadas em diferentes concentrações de Fe em solução nutritiva..... | 40 |
| Figura 5 – Produção de massa seca de parte aérea [MSPA] (A) e produção de massa seca de raiz [MSR] (B) de três cultivares de arroz (Br/Irga 409, Irga 424 e Irga 425) cultivadas em diferentes concentrações de P em solução nutritiva..... | 41 |
| Figura 6 – Produção de massa seca de parte aérea [MSPA] (A) e produção de massa seca de raiz [MSR] (B, C) de três cultivares de arroz (Br/Irga 409, Irga 424 e Irga 425) cultivadas em diferentes concentrações de Fe em solução nutritiva..... | 42 |
| Manuscrito 2 | |
| Figura 1 – Concentrações de nutrientes (P, Fe, Zn, Cu e Mn) no tecido de parte aérea de três cultivares de arroz (Br/Irga 409, Irga 424 e Irga 425) cultivadas sob excesso de +Fe (200mg L ⁻¹) combinado com P (2,5mg L ⁻¹) e +P (25mg L ⁻¹) em solução nutritiva..... | 59 |
| Figura 2 – Concentrações de nutrientes (P, Fe, Zn, Cu e Mn) no tecido de raiz de três cultivares de arroz cultivadas sob excesso de +Fe (200mg L ⁻¹) combinado com P (2,5mg L ⁻¹) e +P (25mg L ⁻¹) em solução nutritiva | 60 |
| Figura 3 – Concentração de clorofila total (A), concentração de carotenoides (B), concentração de malondialdeído (MDA) na parte aérea (C) e na raiz (D) de três cultivares de arroz (Br/Irga 409, Irga 424 e Irga 425) cultivadas sob excesso de +Fe (200mg L ⁻¹) combinado com P (2,5mg L ⁻¹) e +P (25mg L ⁻¹) em solução nutritiva..... | 61 |
| Manuscrito 3 | |
| Figura 1 – Comprimento radicular (A), área superficial (B), diâmetro (C) e volume radicular (D) de três cultivares de arroz (Br/Irga 409, Irga 424 e Irga 425) cultivadas sob excesso de +Fe (200mg L ⁻¹) combinado com P (2,5mg L ⁻¹) e +P (25mg L ⁻¹) em solução nutritiva... | 76 |
| Figura 2 – Organização celular do sistema radicular de cultivares de arroz | |

| | | |
|---------------------|---|-----|
| | (Br/Irga 409 e Irga 425) quando submetidas a concentração de 200 mg L ⁻¹ de Fe, associado com 2,5mg L ⁻¹ de P em solução nutritiva..... | 77 |
| Figura 3 – | Concentração de P total (A), Eficiência de absorção de P [PU _p E] (B) e Eficiência de utilização de P [PU _t E] (C) no tecido de parte aérea de três cultivares de arroz (Br/Irga 409, Irga 424 e Irga 425) cultivadas sob excesso de +Fe (200mg L ⁻¹) combinado com P (2,5mg L ⁻¹) e +P (25mg L ⁻¹) em solução nutritiva..... | 78 |
| Manuscrito 4 | | |
| Figura 1 – | Mudanças na concentração de peróxido de hidrogênio em folhas de três cultivares de arroz cultivadas em diferentes concentrações de Fe (2, 200mg L ⁻¹) e de P (2,5 e 15mg L ⁻¹) em solução nutritiva..... | 102 |
| Figura 2 – | Massa seca de parte aérea (MSPA) de três cultivares de arroz em diferentes concentrações de Fe (2, 200mg L ⁻¹) e de P (2,5 e 15mg L ⁻¹) em solução nutritiva..... | 103 |

LISTA DE TABELAS

Manuscrito 2

- Tabela 1 – Concentrações e disponibilidade de Fe e P na solução nutritiva estimadas pelo software VISUAL MINTEQ 56
- Tabela 2 – Componentes biométricos de crescimento [altura de plantas, número de folhas, número de perfilhos, produção de massa seca de parte aérea (MSPA) e massa seca de raiz (MSR)] de cultivares de arroz (Br/Irga 409, Irga 424 e Irga 425) cultivadas sob excesso de +Fe (200mg L⁻¹) combinado com P (2,5mg L⁻¹) e +P (25mg L⁻¹) em solução nutritiva..... 578
- Tabela 3 – Translocação de nutrientes (fósforo, ferro, zinco, cobre e manganês) de cultivares de arroz (Br/Irga 409, Irga 424 e Irga 425) cultivadas sob excesso de Fe combinado com P (2,5mg L⁻¹) e +P (25mg L⁻¹) em solução nutritiva 58

Manuscrito 3

- Tabela 1 – Concentrações e disponibilidade de Fe e P na solução nutritiva estimadas pelo software VISUAL MINTEQ 74
- Tabela 2 – Componentes biométricos de crescimento [altura de plantas, área foliar, produção de massa seca de parte aérea (MSPA) e massa seca de raiz (MSR)] de cultivares de arroz (Br/Irga 409, Irga 424 e Irga 425) cultivadas sob excesso de +Fe (200mg L⁻¹) combinado com P (2,5mg L⁻¹) e +P (25mg L⁻¹) em solução nutritiva..... 75

Manuscrito 4

- Tabela 1 – Taxa de assimilação líquida do CO₂ (A) e taxa de eficiência de carboxilação da Rubisco (A/Ci) de três cultivares de arroz (Br/Irga 409, Irga 424 e Irga 425) cultivadas em diferentes concentrações de Fe (2, 200mg L⁻¹) e de P (2,5 e 15mg L⁻¹) em solução nutritiva..... 96
- Tabela 2 – Condutância estomática (Gs), concentração intercelular de CO₂ (Ci), peroxidação lipídica (MDA), concentração de clorofila a (Chl a), clorofila b (Chl b), clorofila total (Chl total) e carotenoides (Carot.) em folhas de três cultivares de arroz (Br/Irga 409, Irga 424 e Irga 425) cultivadas em diferentes concentrações de Fe (2, 200mg L⁻¹) e de P (2,5 e 15mg L⁻¹) em solução nutritiva..... 97
- Tabela 3 – Atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD) e guaiacol peroxidase (POD) de três cultivares de arroz (Br/Irga 409, Irga 424 e Irga 425) cultivadas com diferentes concentrações de Fe (2, 200mg L⁻¹) e de P (2,5 e 15mg L⁻¹) em solução nutritiva..... 98
- Tabela 4 – Acumulação e concentração de P nos tecidos de parte aérea de três cultivares de arroz (Br/Irga 409, Irga 424 e Irga 425) cultivadas com diferentes concentrações de Fe (2, 200mg L⁻¹) e de P (2,5 e 15mg L⁻¹) em solução nutritiva..... 99
- Tabela 5 – Acumulação e concentração de Fe nos tecidos de parte aérea de três cultivares de arroz (Br/Irga 409, Irga 424 e Irga 425) cultivadas com diferentes concentrações de Fe (2, 200mg L⁻¹) e de P (2,5 e 15mg L⁻¹) em solução nutritiva..... 100
- Tabela 6 – Massa seca de raiz (MSR) de três cultivares de arroz (Br/Irga 409, Irga 424 e Irga 425) cultivadas com diferentes concentrações de Fe (2, 200mg L⁻¹) e de P (2,5 e 15mg L⁻¹) em solução nutritiva..... 101

SÚMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1. APRESENTAÇÃO | 14 |
| 2. REFERENCIAL TEÓRICO | 16 |
| 2.1. Aspectos gerais: produção de arroz | 16 |
| 2.2. Dinâmica de solos alagados: disponibilidade Fe e P | 16 |
| 2.3. Efeito do Fe no metabolismo da planta | 18 |
| 2.4. Estratégias de aclimação à toxidez por Fe | 20 |
| 2.5. Efeito do P no metabolismo da planta | 22 |
| 2.6. Interação Ferro-Fósforo | 23 |
| 3. PROPOSIÇÃO | 25 |
| 4. MANUSCRITO 1- RESPOSTAS FOTOSSINTÉTICAS E MORFOMÉTRICAS RADICULARES INDUZIDAS POR CONCENTRAÇÕES DE FERRO E DE FÓSFORO EM PLANTAS DE ARROZ (<i>Oryza sativa</i> L.) | 27 |
| RESUMO | 27 |
| INTRODUÇÃO | 28 |
| MATERIAL E MÉTODOS | 29 |
| EXPERIMENTO 1 – Concentrações de Fósforo | 29 |
| EXPERIMENTO 2 – Concentrações de Ferro | 29 |
| VARIÁVEIS ANALISADAS | 30 |
| ANÁLISE ESTATÍSTICA | 31 |
| RESULTADOS | 31 |
| DISCUSSÃO | 33 |
| CONCLUSÕES | 34 |
| REFERÊNCIAS | 35 |
| 5. MANUSCRITO 2- EFEITO MITIGADOR DO FÓSFORO NA TOXICIDADE POR FERRO: COMPOSIÇÃO MINERAL E PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA DE CULTIVARES DE ARROZ (<i>Oryza sativa</i> L.) | 43 |
| RESUMO | 43 |
| INTRODUÇÃO | 44 |
| MATERIAL E MÉTODOS | 45 |
| MATERIAL VEGETAL E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO | 45 |
| VARIÁVEIS ANALISADAS | 46 |
| Componentes biométricos de crescimento | 46 |
| Análise nutricional dos tecidos | 46 |
| Variáveis bioquímicas | 46 |
| ANÁLISE ESTATÍSTICA | 47 |
| RESULTADOS | 47 |
| DISCUSSÃO | 49 |
| CONCLUSÕES | 52 |
| REFERÊNCIAS | 52 |
| 6. MANUSCRITO 3- RESPOSTAS MORFOMÉTRICAS DE RAÍZES E EFICIÊNCIA DE USO DE FÓSFORO DE CULTIVARES DE ARROZ (<i>Oryza sativa</i> L.) CULTIVADAS SOB EXCESSO DE FERRO | 62 |
| RESUMO | 62 |
| INTRODUÇÃO | 63 |
| MATERIAL E MÉTODOS | 64 |
| MATERIAL VEGETAL E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO | 64 |
| VARIÁVEIS ANALISADAS | 65 |

| | |
|--|-----|
| Análises morfométricas e anatômicas de raízes ----- | 65 |
| Componentes biométricos de crescimento ----- | 65 |
| Concentração de P e Eficiência de uso do P ----- | 65 |
| ANÁLISE ESTATÍSTICA ----- | 66 |
| RESULTADOS ----- | 66 |
| DISCUSSÃO ----- | 68 |
| CONCLUSÕES ----- | 70 |
| REFERÊNCIAS ----- | 70 |
| 7. MANUSCRITO 4- IMPLICAÇÕES DA NUTRIÇÃO FOSFATADA NO METABOLISMO FOTOSSINTÉTICO E ANTIOXIDANTE DE CULTIVARES DE ARROZ SOB EXCESSO POR FERRO ----- | 79 |
| RESUMO ----- | 79 |
| INTRODUÇÃO ----- | 80 |
| MATERIAL E MÉTODOS ----- | 81 |
| CONDIÇÃO EXPERIMENTAL ----- | 81 |
| VARIÁVEIS ANALISADAS ----- | 82 |
| Medições de trocas gasosas ----- | 82 |
| Concentração de Pigmentos ----- | 82 |
| Determinação de peróxido de hidrogênio ----- | 82 |
| Determinação da Peroxidação Lipídica (MDA) ----- | 83 |
| Atividade Enzimática ----- | 83 |
| Produção de biomassa e concentração de nutrientes ----- | 84 |
| ANÁLISE DE ESTATÍSTICA ----- | 84 |
| RESULTADOS ----- | 84 |
| DISCUSSÃO ----- | 88 |
| CONCLUSÕES ----- | 91 |
| REFERÊNCIAS ----- | 91 |
| 8. DISCUSSÃO GERAL ----- | 104 |
| 9. CONCLUSÕES GERAIS ----- | 105 |
| 10. REFERÊNCIAS ----- | 107 |

1. APRESENTAÇÃO

O arroz é uma planta anual ou perene, que pode ser cultivada tanto em ambiente alagado como de sequeiro (MACLEAN et al., 2002). Vários fatores ambientais, incluindo a disponibilidade de nutrientes (deficiência/excesso), ocasionam reduções drásticas na produtividade do arroz (MULLER et al., 2015).

A toxidez por Fe é reconhecida como a desordem nutricional de maior ocorrência em áreas de produção de arroz em ambientes alagados (SCHMIDT et al., 2013), como, por exemplo, em regiões da Ásia, América do Sul e África central (SAHRAWAT, 2004). Nestes ambientes, a atividade microbiana do solo favorece a redução de Fe (III) insolúvel em Fe (II) solúvel (DOBERMANN e FAIRHURST, 2000; FAGERIA et al., 2008; WEBER, 2006). De acordo com Ponnampertuma et al. (1978), a concentração solúvel do Fe anterior à submersão do solo raramente excede $0,1 \text{ mg L}^{-1}$, podendo após o alagamento elevar-se, em solos ácidos, a aproximadamente 600 mg L^{-1} , ocasionando altos níveis de estresse para as plantas.

A toxidez por Fe potencializa o estresse oxidativo aumentando a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), como peróxido de hidrogênio, radical superóxido e hidroxil. Os sintomas típicos de toxicidade de Fe, geralmente, se manifestam como manchas marrons minúsculas a partir das pontas que se espalham para a base das folhas inferiores. As raízes tornam-se escassas, mais grossas, curtas e de coloração marrom escuro. Além disso, associado a tais respostas tem-se uma redução na aquisição de nutrientes como potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg) e fósforo (P) (SAHRAWAT et al., 2004; SANTOS, 2006; SOSBAI, 2014).

Nas primeiras semanas de alagamento, ocorre liberação do P ligado a compostos de Fe, seguida de posteriores decréscimos devido ao aumento do pH, ocasionando, consequentemente, a precipitação do fosfato, bem como a sua adsorção a óxidos de Fe de baixa cristalinidade (SOUSA et al., 2010), o que influencia na disponibilidade do P às plantas. Alves et al. (2002) destacam que as plantas desenvolveram uma série de mecanismos morfológicos, fisiológicos e bioquímicos para o uso eficiente de P em condições de baixa disponibilidade, como o desenvolvimento de grandes sistemas radiculares, pelos radiculares mais longos e raízes mais finas, exsudação de ácidos orgânicos de baixo peso molecular, enzimas e associação com micorrizas.

Adicionalmente, para aliviar os efeitos negativos da toxidez por Fe, as plantas desenvolveram mecanismos de compartimentalização celular, exclusão de Fe nas raízes e

detoxificação. No entanto, de acordo com o tipo de solo e duração da ocorrência da toxidez, os genótipos diferem nos seus padrões de resposta (BECKER e ASCH, 2005).

Neste contexto, o estudo do impacto do excesso de Fe sobre a fisiologia das plantas torna-se necessário para as culturas agrícolas (STEIN, 2009). Além disso, quando forem associados a diferentes níveis de aproveitamento de P, tais estudos podem fornecer subsídios para uma maior tolerância e eficiência na absorção de nutrientes. Neste sentido, as hipóteses desse trabalho são as seguintes:

- A capacidade de absorção do P afeta as características morfométricas de raízes que conferem distinções entre cultivares quando submetidas ao excesso de Fe;
- O incremento na concentração do P na solução nutritiva reduzirá o estresse oxidativo ocasionado pelo excesso de Fe, resultando em uma maior produção de fitomassa nas plantas;
- As cultivares tolerantes ao excesso de Fe apresentam diferentes níveis de aproveitamento de P e micronutrientes em relação a cultivar sensível quando submetidas à toxidez de Fe.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Aspectos gerais: produção de arroz

O arroz (*Oryza sativa* L.) é um dos cereais mais importantes no mundo e serve como uma fonte de alimento básico para mais da metade da população mundial (GROSS et al., 2013; MACOVEI et al., 2012). Esta planta pertence à divisão Angiosperma, classe das monocotiledôneas, ordem Glumiflora, família Poaceae, subfamília Bambusoideae ou Oryzoideae, tribo Oryzeae, e gênero *Oryza*. (MAGALHÃES JÚNIOR et al., 2004).

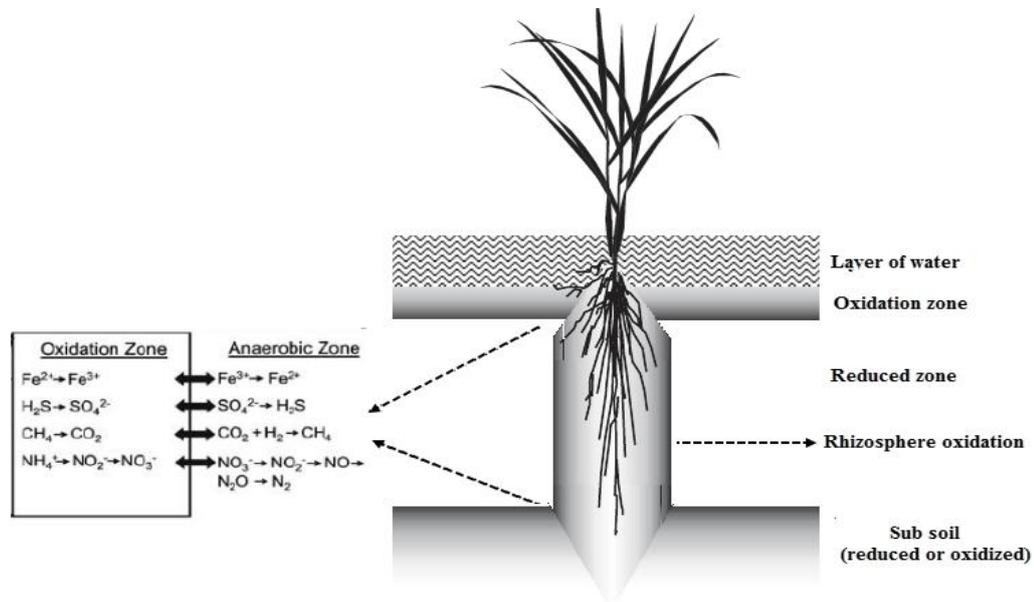
O gênero *Oryza* nomeado por Lineu em 1753 (Vaughan, 1989) possui duas espécies cultivadas, a *Oryza sativa* L. (arroz cultivado asiático) e a *Oryza glaberrima* Steud. (arroz cultivado africano). Com base em uma análise geográfica três subespécies de *O. sativa* estão descritas atualmente, sendo *indica* e *japonica* as mais cultivadas, seguidas pela terceira subespécie conhecida como *javanica* ou *japonica tropical*. O *O. sativa indica* foi domesticado dentro de uma região ao sul da cordilheira do Himalaia, provavelmente ao leste da Índia, em Myanmar e Tailândia, enquanto o *O. sativa japonica* foi domesticado a partir do arroz selvagem no sul da China (LONDO et al., 2006).

Nas regiões tropicais úmidas da Ásia, África e América do Sul a toxidez por Fe é um dos distúrbios nutricionais de ocorrência frequente (SAHRAWAT, 2004, 2010). No Brasil, a toxidez por Fe já foi constatada nos estados do Rio Grande do Sul (RS) e Santa Catarina (SC), que são os principais estados produtores de arroz irrigado. Nessas regiões, a toxidez por Fe era raramente observada até fins da década de setenta, quando predominavam cultivares do tipo tradicional e intermediário. Com o surgimento de novas cultivares, no início da década de oitenta, os produtores e pesquisadores começaram a observar os sintomas de toxidez com maior frequência e intensidade pois as cultivares modernas, apesar de mais produtivas, são mais sensíveis ao problema (SOUSA, 2010).

2.2. Dinâmica de solos alagados: disponibilidade Fe e P

O alagamento promove transformações nas características biogeoquímicas do solo, promovendo alterações no equilíbrio natural do mesmo. Nestes ambientes formam-se duas camadas distintas, uma camada oxidada com a presença de microorganismos aeróbicos e, abaixo dessa, uma camada reduzida com a presença de microorganismos anaeróbicos obrigatórios e facultativos (Figura 1) (FAGERIA et al., 2008; WOLTER, 2010).

Figura 1 – Dinâmica dos nutrientes em solos inundados



Fonte: Adaptado, conforme BECKER & ASCH, (2005).

Os microrganismos aeróbicos obtêm energia através da oxidação do carbono da matéria orgânica do solo, tendo comoceptor final de elétrons o oxigênio, que é reduzido à água. Por sua vez, os microrganismos anaeróbios, usam como eletroceptores os nitratos, óxidos magnênicos, óxidos férricos e sulfatos, que terminam reduzidos a N_2 , óxidos manganosos, óxidos ferrosos e H_2S , respectivamente (KÖGEL-KNABNER et al., 2010; PEZESHKI e DELAUNE, 2012). De acordo com Camargo et al. (1999), o potencial de oxirredução dos solos alagados determina a direção das reações dos sistemas redox (oxigênio, manganês, nitrogênio, ferro, enxofre e carbono) quando fora do equilíbrio. Nestas condições, elevadas quantidades de Fe na forma reduzida (Fe^{2+}) são liberadas para a solução do solo, aumentando a absorção pelas plantas, podendo em casos de excesso, atingir níveis de toxidez (SCHMIDT et al., 2013).

O P é representado por formas orgânicas e inorgânicas variando o grau de disponibilidade às plantas, uma vez que características geoquímicas do solo podem favorecer a retenção de íons de P em seus constituintes sólidos, principalmente a óxidos de Fe e Al (MENDES e JR, 2003; SANCHEZ, 2007). Em solos ácidos predomina a existência de P associado a Fe e Al; porém, com o alagamento e, subsequentemente com a redução dos compostos férricos em ferrosos, ocorre a liberação de P retido por adsorção. Paralelo a isso,

com o aumento dos processos redutivos ocorre um aumento do pH e com isso a solubilidade de diversos compostos é alterada em decorrência da precipitação de fosfato ferroso e adsorção à óxidos de Fe (SOUSA et al., 2010). Os solos derivados de sedimentos de arenito e granito (Planossolos) apresentam redução mais rápida do Fe com liberação do P adsorvido, quando comparados aos solos derivados de sedimento de basalto. Os Planossolos apresentam maior quantidade de P acumulado que os Vertissolos e Chernossolos, sem ou com a adição de superfosfato triplo (GONÇALVES e MUER, 2011).

De acordo com Gonçalves (2007), em solos reduzidos a disponibilidade do P é influenciada por: i) processo de sorção do fosfato (processo de absorção e adsorção simultânea), ii) redução Fe^{+3} em Fe^{+2} , redução do Mn^{+4} a Mn^{+2} ; iii) acréscimo do fator de difusividade (devido ao aumento da disponibilidade de água); iv) mineralização de fosfato orgânico e v) complexação de cátions. O mecanismo de sorção está relacionado com teores e morfologia dos óxidos de Fe, tempo de ocorrência da redução de óxidos férrico a óxido ferroso e pH da solução do solo.

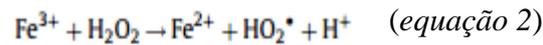
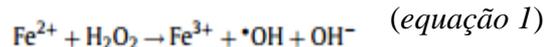
Ponnamperuma (1972) afirma que o aumento dos teores de P na solução, pela redução do Fe^{3+} a Fe^{2+} com o alagamento, depende das características mineralógicas, químicas e eletroquímicas de cada tipo de solo. Shahandeh et al. (2003) estudando a relação da disponibilidade de P com óxidos Fe e Mn presentes nos solos, verificaram que a disponibilidade de P está relacionada com as quantidades de óxidos de Fe pouco cristalinos e óxidos de manganês. Além disso, verificaram que em solos dominados por óxidos de Mn, o processo de redução pode ser uma fonte significativa de P para as plantas.

2.3. Efeito do Fe no metabolismo da planta

Embora seja um dos metais mais abundantes na crosta terrestre, a disponibilidade do Fe em ambientes aeróbicos para as plantas é muito baixa (MORRISSEY e GUERINOT, 2009). Uma vez absorvido, o Fe é transportado em direção ao feixe vascular e translocado para a parte aérea, através do xilema e redistribuído pelo floema. O transporte radial ocorre através das vias simplástica e apoplástica. Para evitar a toxicidade de Fe e facilitar o seu transporte, tem sido documentado que as maiores concentrações de Fe (férrico ou ferroso) celular são quelados. No arroz, a nicotianamina (NA) e o citrato são considerados os quelantes de Fe dominantes (CURIE et al., 2009; KOBAYASHI e NISHIZAWA, 2012).

Em nível celular, as mesmas propriedades que fazem com que o Fe atue como cofator, catalisando e controlando reações redox, também permitem que este funcione de forma

negativa (HELL e STEPHAN, 2003). O Fe^{2+} é capaz de catalisar a decomposição de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) para radical hidroxil ($\cdot\text{OH}$) (equação 1), subsequentemente o Fe^{3+} é reduzido de volta a Fe^{2+} dando continuidade ao processo (equação 2). A soma das reações descritas anteriormente é conhecida como reações Fenton e Haber Weiss (BRIAT et al., 2010).



Estes radicais são altamente tóxicos e atacam as cadeias de ácidos graxos poli-insaturados iniciando o processo de peroxidação lipídica nas membranas e proteínas. Para prevenir danos oxidativos às células, o Fe precisa estar firmemente ligado ou incorporado em estruturas, a exemplo, ligado a proteínas heme e não-heme, que permitem controle de reações de oxidação-redução reversíveis (BROADLEY et al., 2012). De acordo com Balk e Schaedler (2014), as heme-proteínas são estruturas rígidas altamente estáveis, nas quais o Fe é coordenado em um anel tetrapirrólico tendo como ligantes quatro moléculas de nitrogênio. Se um dos ligantes axial está desocupado, o Fe pode ligar-se ao oxigênio e servir como um transportador de oxigênio.

A expressão de sintomas de toxidez por Fe nos tecidos foliares ocorre apenas sob condições inundadas (KÖGEL-KNABNER et al., 2010; PEZESHKI e DELAUNE, 2012). Vários efeitos da toxidez por Fe têm sido relatados na literatura, sendo dois tipos bem distintos, um devido à absorção excessiva (toxidez direta ou bronzeamento) outro por deficiência nutricional múltipla (toxidez indireta ou alaranjamento), que promove redução na absorção de nutrientes (SOSBAI, 2014).

A raiz é o primeiro órgão da planta que entra em contato direto com os metais, tornando-se o primeiro alvo da toxicidade por Fe (ZHANGA et al., 2012). Como resposta, as raízes poderão apresentar alterações anatômicas e, conseqüentemente, ocasionar vários efeitos no metabolismo das plantas (LUX et al., 2011). Sousa et al. (2004) destacam que os principais sintomas de toxidez por Fe em arroz são inicialmente evidenciados nas raízes, as quais tendem a paralisar seu crescimento em extensão e aumentam em espessura (engrossamento), podendo estes sintomas se manifestar em vários estádios de desenvolvimento da planta.

Harahap et al. (2014) estudando a produção de etileno e formação de aerênquima em genótipos de arroz submetidos a diferentes concentrações de Fe, verificaram que os genótipos tem capacidade de oxidar Fe^{2+} na superfície da raiz, assim como observaram que quanto

maior produção de etileno, maior era o tamanho do aerênquima das raízes. Li et al. (2015) verificaram que o grau de inibição do crescimento das raízes foi positivamente dependente da concentração de Fe, promovendo uma redução do alongamento e divisão celular.

Zhang et al. (2011) estudando as células apicais de raízes de plantas de arroz submetidas a níveis elevados de Fe, verificaram que o excesso Fe^{2+} foi tóxico para essas células. O mesmo foi verificado por Xing et al. (2008), em que o aumento da concentração de Fe^{2+} e o tempo de exposição, mostraram inibição significativa na viabilidade das células da ponta das raízes, causando a morte das mesmas.

2.4. Estratégias de aclimação à toxidez por Fe

Para sobreviver em condições de toxidez por Fe as plantas desenvolveram mecanismos morfológicos e fisiológicos para prevenir ou mesmo tolerar tais condições. Assim como, as plantas apresentam mecanismos para absorver Fe em condições de deficiência, estas também apresentam mecanismos para evitar a toxicidade do mesmo (GROSS et al., 2003). Becker e Asch (2005) destacam três tipos principais de estratégias de adaptação que podem ser diferenciadas quanto à toxidez por Fe: a estratégia I (mecanismo de exclusão), a estratégia II (mecanismo de inclusão) e a estratégia III (mecanismo de tolerância ou inativação do Fe nos tecidos das plantas).

Entre os mecanismos desenvolvidos pelas plantas para reduzir a absorção do Fe tem-se o mecanismo de exclusão através da formação da placa férrica. Plantas de arroz possuem a capacidade de transportar o oxigênio das folhas até as raízes através de tecidos especializados denominados de aerênquimas (BECKER e ASCH, 2005; WOLTER, 2010). Por meio da funcionalidade destas estruturas, o Fe^{+2} é insolubilizado, formando uma placa férrica na superfície do sistema radicular. Teoricamente, as plantas que possuem maior capacidade de formar aerênquima transportam mais O_2 para as pontas das raízes, podendo favorecer o seu crescimento e, conseqüentemente, promover maior aprofundamento do sistema radicular. No entanto, neste processo podem ocorrer perdas de O_2 , que são determinadas por características radiculares, como o espessamento da parede celular e volume de aerênquima (COLMER, 2003; EVANS, 2003).

Dan et al. (2010) estudando o efeito da anatomia radicular e da placa férrica sobre a absorção de arsênio, verificaram que as raízes de arroz com maior área superficial específica tendem a formar maior placa férrica, bem como a formação desta afeta a cinética do consumo de arsênio. Nanzyo et al. (2010) analisando a formação da placa férrica e o fosfato de ferro

$[\text{Fe}^3(\text{PO}_4)]_2$ em plantas de arroz, verificaram que as condições de oxidação e redução variam conforme a idade das raízes. Os mesmos autores verificaram diferenças na espessura da placa, quando as raízes mais finas apresentavam placas menos espessas se comparadas as raízes mais grossas. Mei et al. (2012) destacam que a perda radial do O_2 para a rizosfera difere de acordo com o estágio de crescimento, podendo causar mudanças na formação da placa férrica. A redução na oxidação da rizosfera deve-se à senescência da raiz, quando o aerênquima começa a desintegrar, perdendo sua capacidade de transportar O_2 , ocasionando pouca oxidação do Fe na zona radicular. Existe um limiar crítico na formação da placa férrica, pois os efeitos benéficos do poder de oxidação das raízes podem se transformar em respostas negativas, através da deficiência nutricional de nutrientes (ENGEL et al., 2012).

Um outro mecanismo para evitar a toxidez por Fe é a inclusão do Fe em locais como folhas velhas ou fotossinteticamente menos ativas ou, ainda, a exclusão do simplasto, através da imobilização no apoplasto foliar. Este mecanismo é particularmente importante na fase de plântulas, uma vez que neste período as plantas encontram-se com aerênquima pouco desenvolvido (BECKER e ASCH, 2005). Além disso, as plantas podem evitar Fe^{2+} metabolicamente ativo, através da distribuição interna e armazenamento em proteínas chamadas ferritina, as quais podem acomodar até 4.000 átomos de Fe numa forma segura e bio-disponível (BRIAT et al., 2010).

A destoxificação é vital para minimizar os danos causados pelo excesso de Fe^{2+} (STEIN et al., 2014). Devido à forte reatividade com o oxigênio, o Fe quando em excesso, através de reação de Fenton promove a formação de EROs (BRIAT et al., 2010; KOBAYASHI e NISHIZAWA, 2012).

As EROs são altamente tóxicas e responsáveis pelo estresse oxidativo, ocasionando a peroxidação de lipídios de membrana e proteínas (HELL e STHEPAN, 2003). Neste contexto, as células vegetais são equipadas com mecanismos enzimáticos, tais como a superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX), catalase (CAT), guaiacol peroxidase (POD), bem como mecanismos não enzimáticos, como a glutathione (GSH), ácido ascórbico (ASA) carotenoides e tocoferóis (lipossolúvel), que eliminam ou reduzem os efeitos prejudiciais das EROs (YADAVALLI et al., 2012).

Em relação a SOD, esta catalisa a transformação de dois radicais ânions superóxidos (O_2^-) em H_2O_2 e O_2 (CHANG-QUAN e RUI-CHANG, 2008; CHEN et al., 2006). Baseada no metal co-fator utilizado pela SOD, esta é classificada em 3 grupos: SOD Ferro (Fe SOD), SOD Manganês (Mn SOD), SOD Cobre-zinco (Cu-Zn SOD), que estão localizadas em diferentes compartimentos. A Fe-SOD é localizada nos cloroplastos, Mn-SOD na mitocôndria

e peroxissomos e a Cu-Zn SOD nos cloroplastos, citosol, e possivelmente, no espaço extracelular (ALSCHER et al., 2002). A catalase (CAT) e as peroxidases (POX) são proteínas que detoxificam o peróxido de hidrogênio em água (CARVESAN et al., 2012). Bode et al. (1995) destacam que existe uma ligação entre a tolerância ao Fe e a atividade SOD e POD. He et al. (2008), destacam que a atividade da SOD e GPx (glutathione peroxidase) das células tratadas com Fe (II) era mais elevadas em condições de toxidez.

2.5. Efeito do P no metabolismo da planta

Através de várias reações químicas o P é incorporado em compostos orgânicos, incluindo ácidos nucleicos (DNA e RNA), fosfoproteínas, fosfolipídios, enzimas e compostos ricos em energia, como adenosina trifosfato (ATP). O ATP é disponível como uma fonte de energia para muitos outros processos, como fotossíntese, respiração, participando na ativação/inativação de enzimas (BUCHER, 2007; VANCE et al., 2003). Adicionalmente, o P modula várias funções celulares em vias de transdução de sinal e expressão gênica em células (CZARNECKI et al., 2013).

Neste contexto, o P é um importante macronutriente para os vegetais e representa cerca de 0,2% do peso seco das plantas. No entanto, a principal fonte de P para estas é o fosfato inorgânico (Pi), que se caracteriza pela sua fraca disponibilidade e baixa mobilidade (SCHACHTMAN et al., 1998). Para lidar com esta situação, as plantas desenvolveram várias estratégias para otimizar o seu crescimento em condições de limitação de P. A absorção de Pi é dependente de energia que prossegue através de co-transporte H^+/Pi dependente do gradiente eletroquímico de prótons e, portanto, da atividade de uma bomba de extrusão de H^+ tal como a H^+ -ATPase (ULLRICH-EBERIUS et al. 1981, 1984).

Várias características fisiológicas e bioquímicas estão envolvidas para aumentar a eficiência de absorção de P nas culturas. Em geral, o termo eficiência refere-se a habilidade das espécies vegetais em absorver e utilizar os nutrientes ou mesmo relacionar a produtividade das culturas em função da unidade de nutriente aplicado na forma de adubo (FAGERIA e BALIGAR, 2005). Os mecanismos de eficiência de uso do P nas plantas incluem tanto a eficiência de absorção (a capacidade de uma planta para absorver mais P sob condições limitantes) quanto a eficiência de utilização (a capacidade de uma planta produzir um maior rendimento de matéria seca por unidade P absorvida) (BALEMI e NEGISHO, 2012).

As plantas desenvolveram uma diversidade de mecanismos para obter P adequado para seu crescimento em condições limitantes de P, sendo: i) *mecanismos de eficiência de absorção* que incluem modificação da arquitetura radicular, pelos radiculares mais longos e raízes mais finas, exsudação de ácidos orgânicos de baixo peso molecular, prótons e enzimas como fosfatases e fitases, associação de micorriza, transportadores de P de alta afinidade; e ii) *mecanismo para melhorar a eficiência de utilização*: uso de enzimas independentes de P das vias glicolíticas ou mesmo maior capacidade de remobilização de P de outras partes da planta (BALEMI e NEGISHO, 2012).

2.6. Interação Ferro-Fósforo

A interação Fe-P constitui um exemplo da interferência de um elemento sobre o outro (MULLER et al., 2015). Zhang et al. (1999) verificaram decréscimos na concentração de P na parte aérea quando as plantas apresentaram uma maior quantidade da placa férrica nas raízes. Segundo esses autores, é possível que a formação de placa férrica se torne uma barreira, impedindo a difusão de P na superfície das raízes. Liu et al. (2004) destacam que a formação da placa férrica promove uma barreira para a absorção de nutrientes e de metais, tais como Cu, Ni, Mn e Cd, imobilizando-os. Ward et al. (2008) estudando o efeito do Fe sobre o alongamento primário da raiz de *Arabidopsis*, verificaram que a inibição do alongamento primário é um resultado da toxicidade por Fe. No entanto, quando a concentração de Fe no meio deficiente em P é reduzida, observa-se alongamento da raiz primária, indicando que a disponibilidade de Fe pode ser uma estratégia para melhorar a capacidade de uma planta para tolerar a deficiência de P.

Outros trabalhos que buscam explicar a interação P-Fe em processos metabólicos verificaram que a liberação e remobilização do P e do Fe na planta mudam em função da disponibilidade dos mesmos no meio de crescimento. As células vegetais estão envolvidas por uma parede celular, constituída principalmente de celulose e polissacarídeos, incluindo pectina e hemiceluloses (COSGROVE, 2005). De acordo com os mesmos autores, as pectinas constituem um grupo de complexos polissacarídeos (homogalacturonas, ramnogalacturonas I e II, galactanas, arabinans e outros).

Zhu et al. (2015) concluíram que o grupo carboxilato (-COO-) das pectinas pode quelar Fe^{3+} e PO_4^{3-} , os quais podem ficar aprisionados através de uma ligação de -COO-Fe- PO_4 . Zhang et al. (2011) verificaram que o excesso de Fe nas raízes de arroz reduziu o desenvolvimento das células na região periférica das raízes e, conseqüentemente causando o

espessamento das paredes celulares das células da coifa, fato atribuído ao aumento na produção de polissacarídeos pelas células.

As ferritinas, como foi citado anteriormente, são proteínas que apresentam função de reserva, bem como a disponibilizam Fe quando necessário às plantas (BRIAT et al., 2010; LÓPEZ-MILLÁN et al., 2016). Wad et al. (1993) analisando sementes de ervilhas por microscopia eletrônica e espectroscopia de Mössbauer, verificaram um teor relativamente elevado de P (Fe: P = 2,83; 1800 Fe, 640 átomos de P/molécula), sugerindo que a proteína pode estar envolvida tanto no armazenamento de P como de Fe.

Em uma análise geral, pode-se dizer que o efeitos de P sobre a toxidez por Fe são complexos, uma vez que estão envolvidos vários processos distintos que podem ocorrer separadamente ou em conjunto. Desse modo, o entendimento de como as plantas respondem adequadamente às condições nutricionais impostas é de grande importância para o adequado manejo da nutrição de planta.

3. PROPOSIÇÃO

Objetivo geral

- Caracterizar os efeitos da nutrição fosfatada em cultivares de arroz submetidas à toxidez por Fe, identificando possíveis mecanismos de tolerância.

Objetivos específicos

- Determinar as respostas das cultivares de arroz em relação a variação das concentrações de ferro (Fe) e fósforo (P) presentes em solução nutritiva;

- Analisar características morfométricas de raízes e eficiência de uso do P de cultivares de arroz (*Oryza sativa* L.);

- Investigar as respostas nutricionais e a extensão do estresse oxidativo em cultivares de arroz após a exposição excessiva ao Fe, com suprimentos contrastantes de P;

- Investigar através de respostas fotossintéticas e antioxidantes, o efeito da nutrição de fósforo (P) como mitigador da toxidez de ferro (Fe) em cultivares de arroz.

Para tanto foram utilizadas duas cultivares de arroz tolerantes ao excesso de ferro (Irga 425 e Irga 424) provenientes de trabalhos da equipe de Melhoramento Genético do Instituto Rio Grandense do Arroz (IRGA) e uma cultivar sensível (Br/Irga 409) fruto da parceria EMBRAPA com o IRGA. Os cultivos utilizados variaram quanto ao sistema experimental, conforme descrito nos manuscritos para atender os objetivos propostos. Na sequência serão apresentados 4 capítulos (manuscritos):

- 1) RESPOSTAS FOTOSSINTÉTICAS E MORFOMÉTRICAS RADICULARES INDUZIDAS POR CONCENTRAÇÕES DE FERRO E DE FÓSFORO EM PLANTAS DE ARROZ (*Oryza sativa* L.)
- 2) EFEITO MITIGADOR DO FÓSFORO NA TOXICIDADE POR FERRO: COMPOSIÇÃO MINERAL E PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA DE CULTIVARES DE ARROZ (*Oryza sativa* L.)
- 3) RESPOSTAS MORFOMÉTRICAS DE RAÍZES E EFICIÊNCIA DE USO DE FÓSFORO DE CULTIVARES DE ARROZ (*Oryza sativa* L.) CULTIVADAS SOB EXCESSO DE FERRO

4) IMPLICAÇÕES DA NUTRIÇÃO FOSFATADA NO METABOLISMO FOTOSINTÉTICO E ANTIOXIDANTE DE CULTIVARES DE ARROZ SOB EXCESSO POR FERRO

4. MANUSCRITO 1

RESPOSTAS FOTOSSINTÉTICAS E MORFOMÉTRICAS RADICULARES INDUZIDAS POR CONCENTRAÇÕES DE FERRO E DE FÓSFORO EM PLANTAS DE ARROZ (*Oryza sativa* L.)

PHOTOSYNTHETIC RESPONSES AND ROOT MORPHOMETRIC CHANGES INDUCED IN RICE PLANTS BY VARIED IRON AND PHOSPHORUS CONCENTRATIONS (*Oryza sativa* L.)

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo determinar as respostas de cultivares de arroz em relação a variação das concentrações de ferro (Fe) e fósforo (P) presentes em solução nutritiva. Para tanto, foram utilizados parâmetros de crescimento de raízes e de parte aérea, bem como parâmetros de trocas gasosas relacionados a fotossíntese. Os experimentos foram realizados em casa de vegetação, utilizando três cultivares de arroz (Br/Irga 409, Irga 424, Irga 425). No experimento 1 as plantas foram cultivadas em quatro concentrações de P (2,5, 15, 25 e 35mg L⁻¹) em solução nutritiva. No experimento 2 as plantas foram cultivadas em quatro concentrações de Fe (2, 100, 200 e 300mg L⁻¹) em solução nutritiva. As variáveis taxa de assimilação líquida de CO₂ (A) e eficiência de carboxilação da Rubisco (A/Ci) aumentaram com o aumento nas concentrações de P (15 e 25mg L⁻¹) na solução nutritiva. Por outro lado, as plantas apresentaram diminuições na A, A/Ci e condutância estomática (Gs) nas maiores concentrações de Fe (200 e 300mg L⁻¹), o que causou menor produção de massa seca de parte aérea. Independente das concentrações de Fe e P utilizadas na solução nutritiva, não ocorreram diferenças significativas quanto a concentração intercelular de CO₂. Com aumento na concentração de P e Fe na solução nutritiva, verificou-se reduções em todas as variáveis morfométricas radiculares analisadas (comprimento radicular, área superficial, volume e diâmetro radicular). Diante dos resultados, foram selecionadas as concentrações de P (2,5, 15, 25mg L⁻¹) e de Fe (200mg L⁻¹) para obtenção de respostas morfométricas radiculares, nutricionais, fisiológicas e bioquímicas de cultivares de arroz.

Palavras chave: Fotossíntese, Nutrição mineral, Toxidez, *Oryza sativa* L.

ABSTRACT

The aim of this study was to determine the responses of rice cultivars in relation to the variation in the concentration of iron (Fe) and phosphorus (P) in nutrient solution. Therefore, growth parameters of roots and shoot, as well as gas exchange parameters related to photosynthesis. The experiments were carried out in a greenhouse using three rice cultivars (Br/Irga 409, Irga 424, Irga 425). In experiment 1, plants were submitted to four concentrations of P (2,5, 15, 25 e 35mg L⁻¹) in nutrient solution. In experiment 2, plants were grown at four concentrations of Fe (2, 100, 200 e 300mg L⁻¹) in nutrient solution. The variables liquid assimilation rate of CO₂ (A) and carboxylation efficiency of Rubisco (A/Ci) increased with the increase in P concentration (15 e 25mg L⁻¹) in the nutrient solution. On the other hand, the plants showed decreases in A, A/Ci e Gs at the high concentrations of Fe (200

e 300mg L^{-1}), which caused lower production of dry mass of shoot. Independently of concentrations of Fe and P used in the nutrient solution, there were no significant differences in the intercellular concentration of CO_2 . With increase in the concentration of P and Fe in the nutrient solution, all root morphometric parameters (root length, surface area, volume and root diameter) were decreased. From these results, concentrations of P (2,5, 15, 25mg L^{-1}) and Fe (200mg L^{-1}) were selected to further study the effect of these two nutrients on the responses of root morphometric parameters, as well as alterations in nutritional, physiological and biochemical responses of rice cultivars.

Keywords: Photosynthesis, Mineral nutrition, Toxicity, *Oryza sativa* L.

INTRODUÇÃO

A produção das culturas agrícolas depende de vários fatores, dentre os quais a disponibilidade de nutrientes em quantidade e em equilíbrio, pois a deficiência ou a toxidez de um determinado nutriente influencia na atuação dos demais (CARNEIRO, 2006).

O Fe é um micronutriente e devido à sua capacidade de ganhar e perder elétrons funciona como um cofator para enzimas envolvidas em uma grande variedade de reações de oxidação-redução (fotossíntese, respiração, síntese de hormônios, síntese de DNA) (ROUT e SAHOO, 2015). No entanto, quando o Fe se acumula em concentrações elevadas nos vegetais, pode atuar de forma catalítica através da reação de Fenton para gerar radicais hidroxil, que podem danificar lipídios, proteínas e DNA (CONNOLLY e GUERINOT, 2005).

O P é um macronutriente, por desempenhar um papel central em praticamente todos os principais processos metabólicos. O P faz parte da estrutura dos ácidos nucleicos (DNA e RNA), fosfoproteínas, fosfolípidos, enzimas e compostos fosfatados ricos em energia (Trifosfato de adenosina (ATP)) (AHEMAD et al., 2009).

As interações que ocorrem entre os nutrientes afetam desde processos que ocorrem nos solos (contato com a raiz) até mecanismos que ocorrem nos vegetais como absorção, transporte e redistribuição, podendo induzir deficiências ou toxidez, conseqüentemente refletindo na composição mineral das plantas (FAGERIA, 2001; ROBSON e PITMAN, 1983). Existe uma interação clássica entre Fe e P, segundo a qual a presença de altas concentrações de Fe nos solos ou solução nutritiva comprometem a absorção de P pelas plantas, e vice-versa. As interações dos nutrientes são geralmente medidas em termos de resposta ao crescimento e mudança nas concentrações dos mesmos. Após a adição de dois nutrientes, pode ocorrer interações positivas (sinérgicas) ou negativas (antagônicas). Na maioria das vezes, são interações complexas que podem induzir a toxicidade, assim como as

plantas podem modificar as respostas de crescimento de acordo com as condições nutricionais impostas (FAGERIA, 2001). Neste contexto, antes de estudar a interação do P e Fe no crescimento do arroz em solução nutritiva, o presente trabalho teve como objetivo determinar as respostas de cultivares de arroz em relação a variação das concentrações de Fe e P presentes em solução nutritiva. Para tanto, foram utilizados parâmetros de crescimento de raízes e de parte aérea, bem como parâmetros de trocas gasosas relacionados a fotossíntese.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado em casa de vegetação localizada no campus da Universidade Federal de Santa Mara, RS. Utilizaram-se três cultivares de arroz: IRGA 425, IRGA 424 e BR IRGA 409 diferindo em relação a toxidez por Fe. As sementes inicialmente foram umedecidas em água destilada permanecendo a 25°C, no escuro durante 24 horas em placas de petri. Após este período as sementes pré-germinadas foram transferidas para caixas revestidas com papel germiteste parcialmente fechadas, sendo irrigadas com água destilada por 7 dias, em câmaras de crescimento climatizada.

EXPERIMENTO 1 – Concentrações de Fósforo

Após 7 dias em água destilada, 10 plântulas foram transferidas para vasos contendo 5 L de solução nutritiva desenvolvida por Yoshida et al. (1976) com pequenas modificações. A solução nutritiva usada para aclimatar as plântulas durante 7 dias teve a seguinte composição: 40mg L⁻¹ NH₄NO₃, 2,5mg L⁻¹NaH₂PO₄.2H₂O, 40mg L⁻¹ K₂SO₄, 40mg L⁻¹CaCl₂, 40mg L⁻¹ MgSO₄. 7H₂O, 0,5mg L⁻¹MnCl₂.4H₂O, 0,05mg L⁻¹ (NH₄)₆.MO₇O₂₄.4H₄O, 0,2mg L⁻¹H₃BO₃, 0,01mg L⁻¹ZnSO₄.7H₂O, 0,01mg L⁻¹ CuSO₄. 5H₂O, 2mg L⁻¹ Fe₂SO₄.7H₂O.

Após o período de aclimação, as plantas foram submetidas aos tratamentos com diferentes concentrações de P na solução nutritiva. Os tratamentos foram dispostos em esquema fatorial 3x4, sendo três cultivares (Br/Irga 409, Irga 424 e Irga 425) e quatro concentrações de P (2,5, 15, 25 e 35mg L⁻¹), com 4 repetições. As soluções foram renovadas a cada 5 dias e o pH ajustado em 6,0± 0.1 pela adição de NaOH ou HCl 0,5mol L⁻¹.

EXPERIMENTO 2 – Concentrações de Ferro

Após 7 dias em água destilada, 4 plântulas foram transferidas para vasos contendo 1,2 L de solução nutritiva desenvolvida por Yoshida et al. (1976) com pequenas modificações. A solução nutritiva usada para aclimatar as plântulas durante 7 dias teve a seguinte composição: 40mg L⁻¹ NH₄NO₃, 2,5mg L⁻¹NaH₂PO₄.2H₂O, 40mg L⁻¹K₂SO₄, 40mg L⁻¹CaCl₂, 40mg L⁻¹MgSO₄. 7H₂O, 0,5mg L⁻¹MnCl₂.4H₂O, 0,05mg L⁻¹ (NH₄)₆.MO₇O₂₄.4H₄O, 0,2mg L⁻¹H₃BO₃, 0,01mg L⁻¹ZnSO₄.7H₂O, 0,01mg L⁻¹ CuSO₄. 5H₂O, 2mg L⁻¹ EDTA-Fe₂SO₄.7H₂O.

Após o período de aclimação, as plantas foram submetidas aos tratamentos com diferentes concentrações de Fe na solução nutritiva. Os tratamentos foram dispostos em esquema fatorial 3x4, sendo três cultivares (Br/Irga 409, Irga 424 e Irga 425) e quatro concentrações de Fe (2, 100, 200 e 300mg L⁻¹), com 4 repetições. As soluções foram renovadas a cada 2 dias e o pH ajustado em 5,0± 0.1 pela adição de NaOH ou HCl 0,5 mol L⁻¹.

VARIÁVEIS ANALISADAS

Após 15 dias de exposição aos tratamentos isolados de Fe e P foram determinadas as variáveis de trocas gasosas, as características morfoométricas de raízes, a produção de massa seca de raiz (*MSR*) e de parte aérea (*MSPA*).

As medições de trocas gasosas foram realizadas no terço médio de folhas totalmente expandidas, com a utilização do medidor portátil Infra Red Gas Analyzer (IRGA), marca LICOR, modelo LI-6400 XT, utilizando uma radiação fotossintética de 1500µmol m⁻² s⁻¹ e concentração de CO₂ de 400µmol mol⁻¹. Foram utilizadas duas plantas por repetição de cada tratamento e as leituras foram realizadas entre as 8 e 11 horas da manhã. Foram determinadas: a taxa de assimilação líquida de CO₂ (*A*), condutância estomática (*G_s*), concentração intercelular de CO₂ (*C_i*) e eficiência de carboxilação da Rubisco (*A/C_i*).

As raízes de 4 plantas por repetição foram distribuídas em bandeja de acrílico (30 × 60 cm) com lâmina de 0,5cm de água e digitalizadas com auxílio de escâner (EPSON Expression 11000XL) equipado com unidade de transparência (TPU) com varredura em 600dpi para as raízes. As imagens foram analisadas utilizando-se o programa WinRhizo[®] Pro 2013 (Regent Instruments Canada Inc, Québec, Canada) para obtenção das seguintes variáveis: comprimento radicular, área superficial radicular, volume e diâmetro radicular. Já a produção de massa seca de parte aérea (*MSPA*) e raiz (*MSR*) foi avaliada em amostras secas em estufa a 60 °C até peso constante.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os experimentos foram submetidos aos testes de pressuposição do modelo matemático e, para a ANOVA, foi utilizado um modelo bi fatorial. Quando houve interação entre os fatores, foi realizada análise de regressão das concentrações de P e comparação das médias das cultivares dentro das concentrações de P, através do Teste Scott Knott, ambos a 5% de probabilidade de erro (experimento 1). No caso de não haver interação entre os fatores, foi realizada somente a análise de regressão para concentrações de P e o teste de Scott Knott para as cultivares, também a 5% de probabilidade de erro. O mesmo procedimento estatístico descrito anteriormente foi realizado com os resultados do experimento 2. Todas as análises foram realizadas por meio do programa estatístico SISVAR (Universidade Federal de Lavras, Lavras, Brasil).

RESULTADOS

No experimento 1, a taxa de assimilação líquida de CO₂ (*A*) e a eficiência de carboxilação da Rubisco (*A/Ci*) apresentaram resposta quadrática a concentração de P, tendo o ponto de máxima eficiência próximo a concentração de 15mg L⁻¹ de P. No entanto, na maior concentração de P (35mg L⁻¹) verificou-se uma diminuição acentuada na *A* e *A/Ci* (Figura 1A e 1B). Independente das concentrações de P estudadas, a cultivar Irga 424 apresentou maior condutância estomática (*Gs*) do que as outras duas cultivares (Figura 1C).

No experimento 2, o aumento na concentração de Fe na solução nutritiva decresceu linearmente a *A* e a *A/Ci* (Figura 2A e 2B). Verificou-se redução na *Gs*, com ajuste de equação quadrática com o aumento na concentração de Fe na solução nutritiva, com ponto de mínima eficiência técnica próximo da concentração de 200mg L⁻¹ de Fe (figura 2C). A concentração intercelular de CO₂ (*Ci*) não apresentou diferença significativa nas concentrações de P e Fe testadas na solução nutritiva.

No geral, as variáveis morfométricas de raízes comprimento radicular, área superficial, volume e diâmetro radicular foram afetadas pelo fator isolado de cultivares e concentração de P [Experimento 1] (Figura 3), e também pelo fator isolado de cultivares e concentrações de Fe [Experimento 2] (Figura 4).

O comprimento e a área superficial radicular diminuíram drasticamente com o aumento na concentração de P, onde a resposta foi quadrática com ponto de mínima eficiência técnica próximo de 35mg L⁻¹ de P (Figura 3A, 3B). Verificou-se redução significativa no

volume radicular, com ajuste de equação linear, com aumento na concentração de P na solução nutritiva (Figura 3C).

Independente das concentrações de P estudadas, as cultivares Br/Irga 409 e Irga 424 apresentaram maior comprimento e área superficial radicular em relação a cultivar Irga 425 (Figura 3D, 3E). Quanto ao volume (Figura 3F) e diâmetro radicular (Figura 3G) a cultivar Br/Irga 409 apresentou maiores valores, em relação as outras duas cultivares.

Com aumento na concentração de Fe na solução nutritiva, o comprimento radicular respondeu de forma quadrática negativa, com redução de 52% na concentração de 300mg L^{-1} de Fe (Figura 4A). A área superficial radicular (Figura 4B) e o volume radicular (Figura 4C) decresceram linearmente com o aumento da concentração de Fe na solução nutritiva. Por outro lado, o diâmetro radicular aumentou linearmente com o aumento na concentração de Fe (Figura 4D).

Independente da concentração de Fe na solução nutritiva, verificou-se que a cultivar Irga 425 seguida da Irga 424 apresentaram maior comprimento radicular do que a Br/Irga 409 (Figura 4E). A cultivar Irga 425 manteve maior área superficial (Figura 4F) e volume radicular (Figura 4G) em relação as outras duas cultivares.

Quanto a produção de MSPA e MSR [experimento 1], houve resposta ao fator isolado cultivares (Figura 5). Independente das concentrações de P estudadas, as cultivares Br/Irga 409 e Irga 425 apresentaram maior produção de MSPA, quando comparadas com a cultivar Irga 424 (Figura 5A). Já em relação a produção de MSR, apenas a Br/Irga 409 apresentou maior valor em relação as outras duas cultivares (Figura 5B).

Para a produção de MSPA [experimento 2], houve resposta a interação concentrações de Fe e cultivares. No tratamento controle de Fe (2mg L^{-1}), a cultivar Irga 425 apresentou maior produção de MSPA em relação as outras duas cultivares. No entanto, todas as cultivares apresentaram uma resposta quadrática decrescente com aumento na concentração de Fe na solução nutritiva (Figura 6A).

Já em relação a produção de MSR houve resposta ao fator isolado de cultivares e concentrações de Fe. A produção de MSR decresceu linearmente com o aumento da concentração de Fe na solução nutritiva (Figura 6B). Independente das concentrações de Fe estudadas, as cultivares Br/Irga 409 e Irga 425 apresentaram maior produção de MSR, quando comparadas com a cultivar Irga 424 (Figura 6C).

DISCUSSÃO

A fotossíntese é um processo fisiológico primário, em que o CO_2 difunde-se por um gradiente de concentração a partir da atmosfera até os cloroplastos, onde ocorre o metabolismo redutivo do carbono. O adequado suprimento de P é essencial nesta fase, devido à alta demanda por intermediários fosforilados, bem como através da modulação de enzimas envolvidas na fixação de carbono (PANDEY et al., 2015; RAO, 1996).

No presente trabalho verificou-se que próximo as concentrações de 15 e 25mg L⁻¹ de P, obteve-se os maiores valores de A e A/C_i (Figura 1A, 1B). YONG-FU et al. (2006) estudando o efeito da disponibilidade de P em genótipos de arroz, verificaram que as plantas cultivadas em deficiência de P apresentaram reduções na A , quando comparada com as plantas supridas com P.

Independente das concentrações de P estudadas, a cultivar Irga 424 apresentou maior condutância estomática em relação as outras duas cultivares (Figura 1C), podendo esta característica favorecer o processo fotossintético, desde que exista boa disponibilidade hídrica às plantas. A regulação estomática deve operar para assegurar um equilíbrio apropriado na absorção de CO_2 para fotossíntese, afim de controlar a quantidade de carbono interno para atender a capacidade de carboxilação e regeneração da ribulose 1,5 bifosfato, e a perda de água por transpiração (LAWSON, et al., 2014, OHSUMI et al., 2007).

A planta necessita de um ajuste fino de importação e exportação de Fe para os cloroplasto (BRIAT et al., 2007). No entanto, apesar de ser um micronutriente fundamental para o crescimento e desenvolvimento das plantas, quando em excesso, o Fe pode ser tóxico ao metabolismo vegetal (SAHRAWAT, 2004).

No geral, no presente trabalho o aumento nas concentrações de Fe na solução nutritiva diminuiu a A e a A/C_i (Figura 2A e 2B). Possivelmente, o excesso de Fe induziu a produção de espécies reativas de oxigênio, as quais afetaram a funcionalidade do processo fotossintético. O excesso de Fe também pode reduzir a concentração de pigmentos fotossintetizantes (JUCOSKI et al., 2016). Estudos com batata evidenciaram que altas concentrações de Fe afetaram a funcionalidade da fase fotoquímica da fotossíntese (ADAMSKI et al., 2011), resultando em comprometimento na dissipação de energia, e consequentemente causando diminuição na A .

Devido à grande plasticidade do sistema radicular, as plantas são capazes de sobreviver em diferentes ambientes do solo. No entanto, a manutenção de um adequado sistema de divisão e diferenciação celular das raízes depende de respostas a estímulos

ambientais, uma vez que estão em contato direto com o ambiente do solo, e portanto, são particularmente afetadas por condições desfavoráveis (PERILLI et al., 2012; SMITH et al., 2012).

No presente trabalho todas as plantas apresentaram maiores valores de comprimento e área superficial radicular na menor concentração de P ($2,5\text{mg L}^{-1}$) (Figura 3A, 3B). Sob condições limitadas de P, a soma do comprimento da raiz primária e das raízes laterais, obtém-se um valor similar ao alcançado pela raiz primária sob suficiência de P, sugerindo modificação na exploração do solo, devido ao maior volume radicular (SILVA e DELATORRE, 2009).

Com aumento nas concentrações de Fe na solução nutritiva, verificou-se reduções acentuadas nas características morfométricas radiculares [comprimento, área superficial e volume radicular] (Figura 4A, 4B, e 4C), fato que não foi observado para o diâmetro radicular (Figura 4D). O excesso de Fe reduz o desenvolvimento das células das raízes e causa o espessamento das paredes celulares (ZHANG et al., 2011), conseqüentemente influenciando no diâmetro radicular.

Ocorreu variabilidade entre as cultivares aos tratamentos utilizados. No experimento 1, a cultivar Br/Irga 409 apresentou maior valor de volume radicular (Figura 3F) em relação as outras cultivares, refletindo em maior produção de MSR (Figura 5B). Já no experimento 2, a cultivar Irga 425 apresentou maiores valores nas variáveis morfométricas radiculares (figura 4E, 4F e 4G), refletindo em maior produção de MSR (Figura 6C). Possivelmente, o comportamento observado da cultivar indica um mecanismo de defesa ao excesso de Fe.

A partir dos resultados, foram selecionadas as concentrações de P ($2,5$, 15 , 25mg L^{-1}) com 200mg L^{-1} de Fe, para obtenção de respostas morfométricas radiculares, nutricionais, fisiológicas e bioquímicas de três cultivares (Br/Irga 409 Irga 424 e Irga 425) de arroz.

CONCLUSÕES

Ocorreu variabilidade entre as cultivares aos tratamentos de Fe e P, validando a escolha das cultivares para realização de experimentos posteriores. As cultivares Irga 424 e Br/Irga 409, em geral, obtiveram melhor resposta quando submetidas aos tratamentos com fósforo, enquanto a Irga 425 foi a cultivar que mais tolerou o aumento da concentração de Fe;

As maiores respostas na taxa de assimilação líquida de CO_2 e eficiência de carboxilação da Rubisco foram obtidas nas concentrações de 15 e 25mg L^{-1} de P;

Os maiores danos morfológicos radiculares e a menor a produção de massa seca de parte aérea e a produção de massa seca de raiz foram observados nas concentrações de 200 e 300mg L⁻¹ de Fe.

REFERÊNCIAS

- ADAMSKI, J. M. et al. Excess iron-induced changes in the photosynthetic characteristics of sweet potato. **Journal of Plant Physiology**, v. 68, p. 2056-2062, 2011.
- AHEMAD, M. et al. Biological importance of phosphorus and phosphate solubilizing microbes-an overview. In: Phosphate solubilising microbes for crop improvement. ed: M. S. Khan and A. Zaidi; p. 1-14, 2009.
- BRIAT, J. F.; CURIE, C.; GAYMARD, F. Iron utilization and metabolism in plants. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 10, p. 276–282, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2007.04.003>.
- CARNEIRO, L. F. Fontes, doses e modos de aplicação de fósforo na interação fósforo-zinco em milho. 2006. 75 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia)- Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006.
- CONNOLLY, E. L.; GUERINOT, M. L. Iron stress in plants. **Genome Biol.** v. 3, n. 8, reviews1024.1–reviews1024.4.
- FAGERIA, V. D. Nutrient interactions in crop plants. **Journal of Plant Nutrition.** v. 24, p. 1269-1290, 2001. DOI: <http://dx.doi.org/10.1081/PLN-100106981>.
- JUCOSKI, G. O. et al. Excesso de ferro sobre o crescimento e a composição mineral em *Eugenia uniflora* L. **Revista Ciência Agronômica.** v. 46, p. 720-728, 2016.
- LAWSON, T. et al. Mesophyll photosynthesis and guard cell metabolism impacts on stomatal behavior. **New Phytologist.** v. 203, p.1064–1081, 2014. DOI: 10.1111/nph.12945.
- OHSUMI, A. et al. Genotypic variation of stomatal conductance in relation to stomatal density and length in rice (*Oryza sativa* L.). **Plant Production Science.** v. 10, p. 322-328, 2007. DOI: <http://doi.org/10.1626/pp.s.10.322>.
- PANDEY, A. R. et al. Physiological and molecular alterations in plants exposed to high [CO₂] under phosphorus stress. **Biotechnology Advances.** v. 33, p. 303-16, 2015. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2015.03.011.
- PERILLI, S.; DI, M. R.; SABATINI, S. Growth and development of the root apical meristem. **Curr. Opin. Plant Biol.** v. 15, p. 17–23, 2012. DOI: 10.1016/j.pbi.2011.10.006.

RAO, I. M. The role of phosphorus in photosynthesis. In: PESSARAKLI, M. **Handbook of Photosynthesis**. New York: Marcel Dekker. cap. 11, p. 173-194.

ROBSON, A. D.; PITMAN, M. G. Interactions between nutrients in higher plants. **Inorganic Plant Nutrition**. v. 15, p. 147-180, 1983.

ROUT, G.R.; SAHOO, S. Role of iron in plant growth and metabolism. **Reviews in Agricultural Science**. v. 3, p. 1-24, 2015. DOI:10.7831/ras.3.1

SAHRAWAT, K. L. Iron toxicity in wetland rice and the role of other nutrients. **Journal Plant Nutrition**. v. 27, p. 1471-1504, 2004.

SILVA, A. A.; DELATORRE, C. A. Alterações na arquitetura de raiz em resposta à disponibilidade de fósforo e nitrogênio. **Revista de Ciências Agroveterinárias**. v. 8, p. 152-163, 2009.

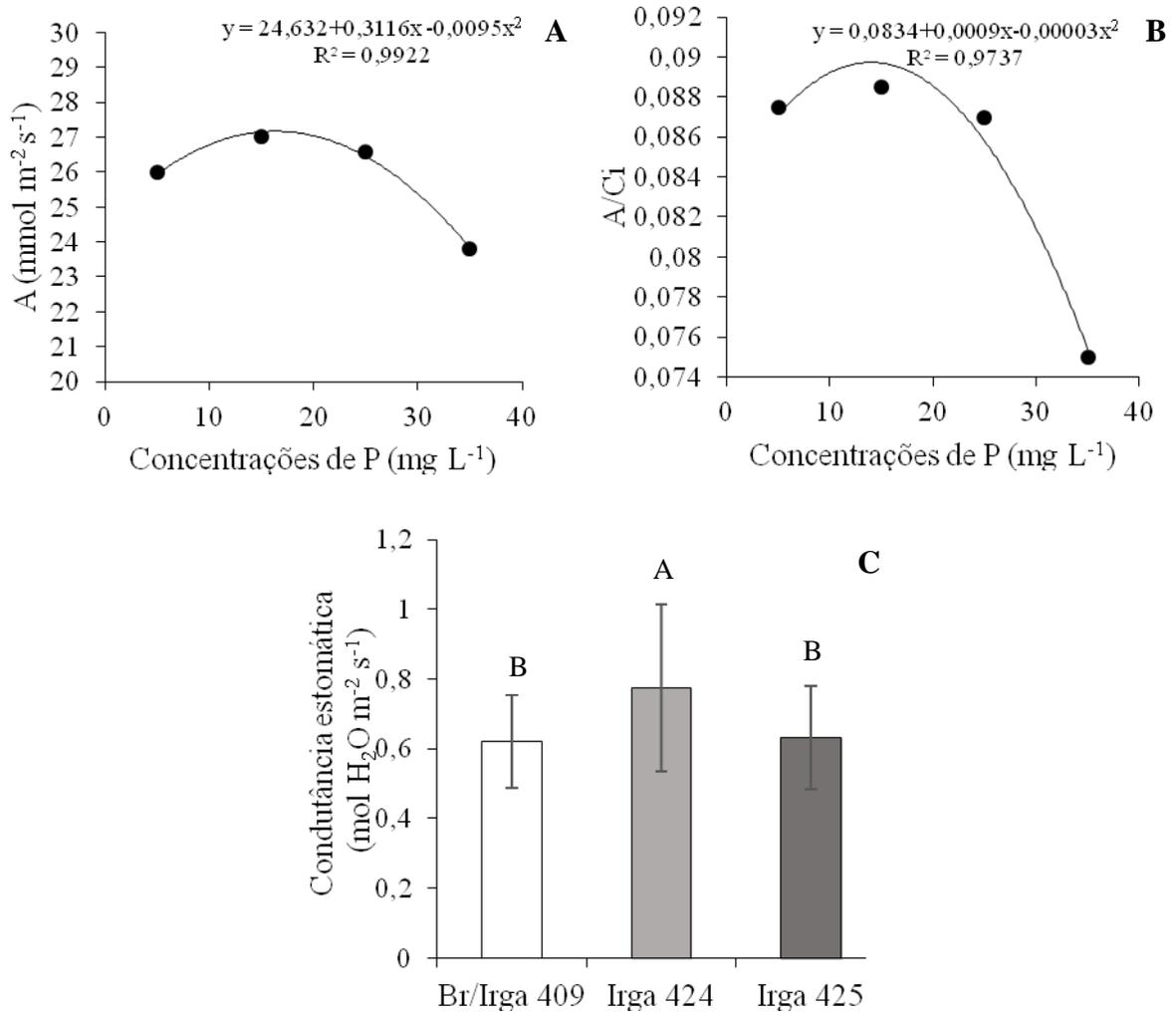
SMITH, S.; SMET, I. D. Root system architecture: insights from Arabidopsis and cereal crops. **Biological Sciences**. v. 367, p. 1441–1452, 2012. DOI: 10.1098/rstb.2011.0234.

YONG-FU, L. et al. 2002. Effect of phosphorus deficiency on leaf photosynthesis and carbohydrates partitioning in two rice genotypes with contrasting low phosphorus susceptibility. **Ann Bot**. v. 90, p. 745–753, 2002.

YOSHIDA, S. et al. **Laboratory manual for physiological studies of rice**. Philippines: The International Rice Research Institute, 1976. 82 p.

ZHANG, Y. et al. Morphological and physiological responses of root tip cells to Fe²⁺ toxicity in rice. **Acta Physiol Plant**. v. 33, p. 683-689, 2011.

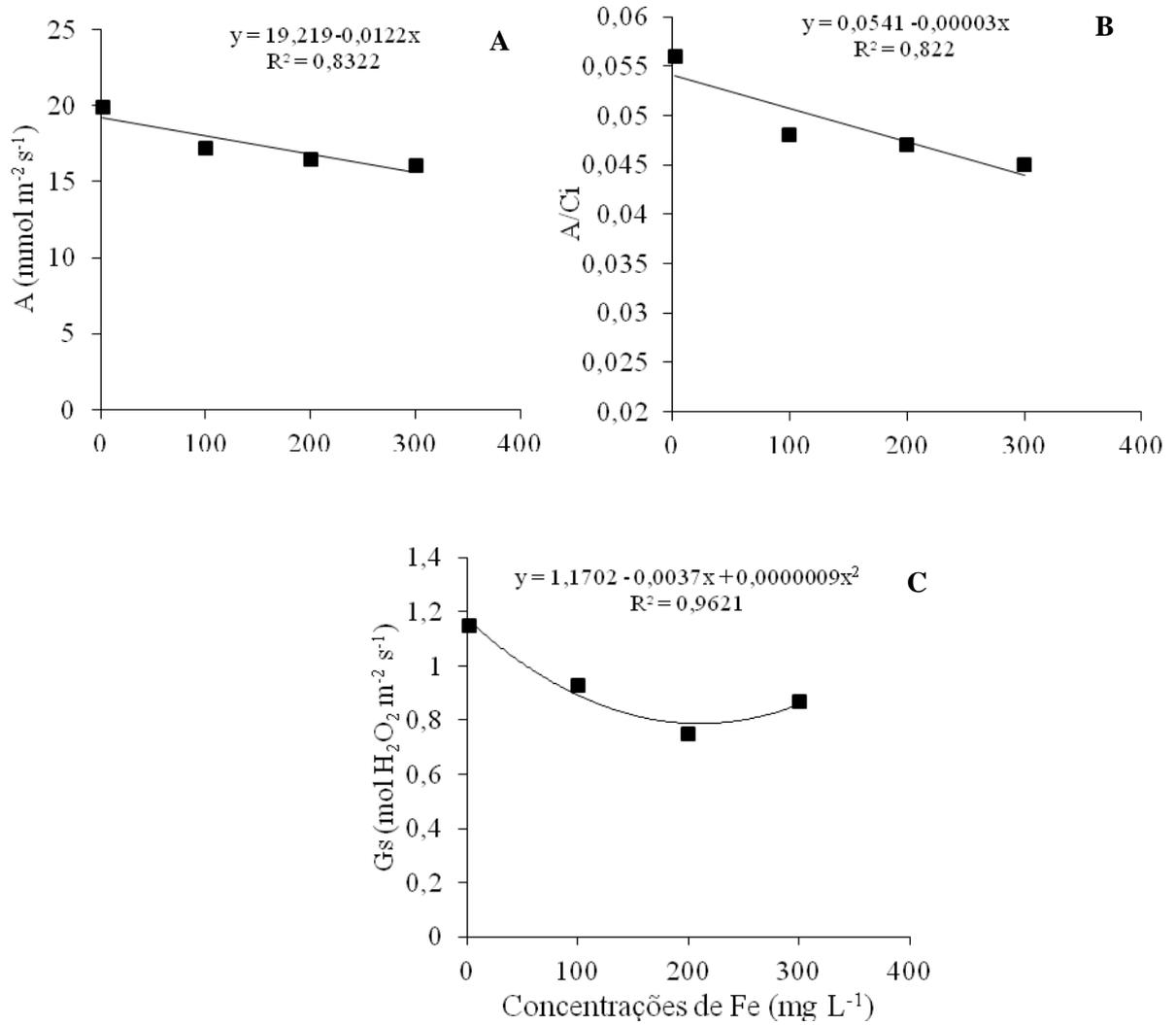
Figura 1 – Taxa de assimilação líquida de CO_2 [A] (A), eficiência de carboxilação da Rubisco [A/Ci] (B) e condutância estomática [Gs] (C) de três cultivares de arroz (Br/Irga 409, Irga 424 e Irga 425) cultivadas com diferentes concentrações de P em solução nutritiva



*Cada linha de tendência refere-se à equação ajustada às concentrações de P.

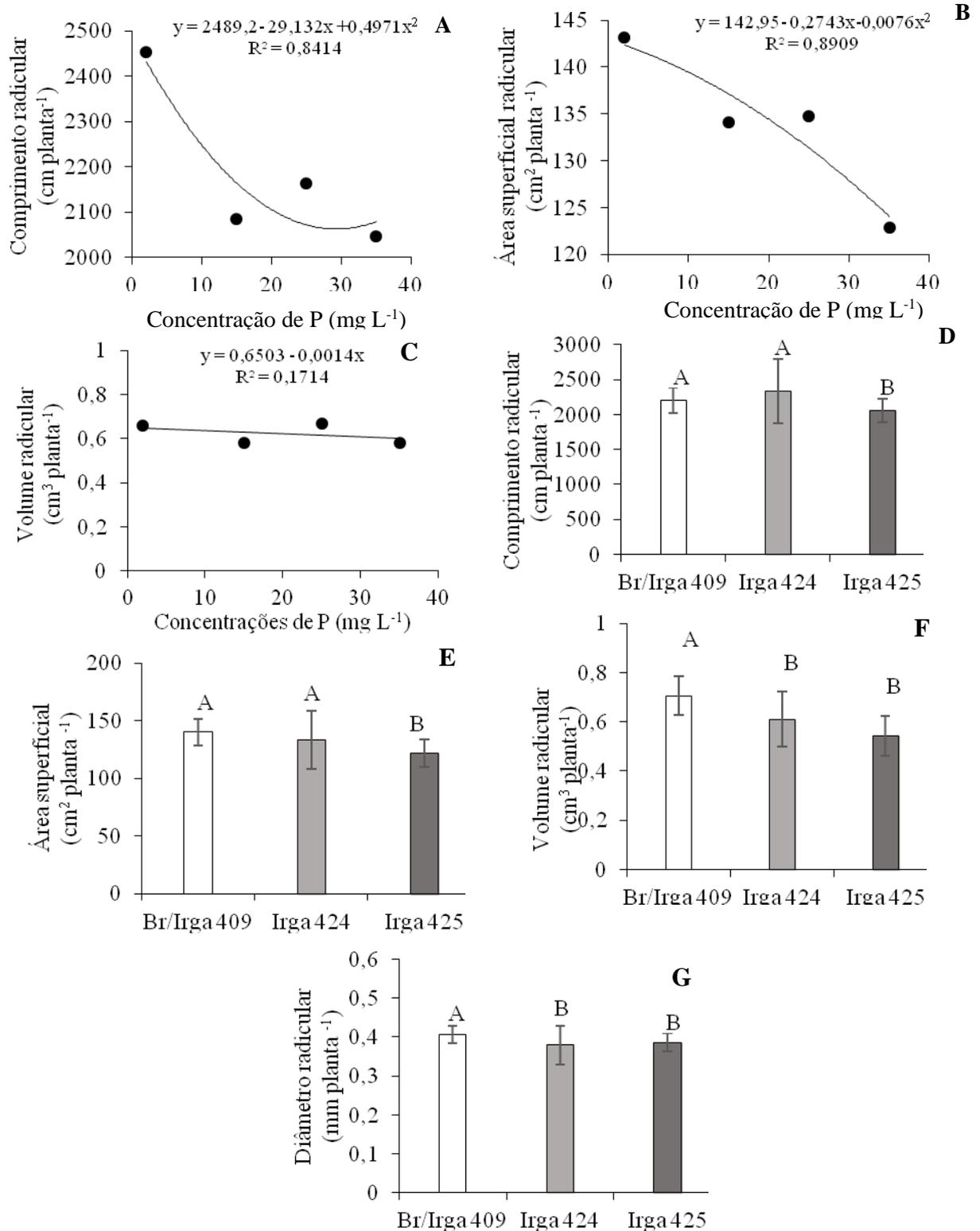
**Letras maiúsculas diferentes indicam diferença entre cultivares pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade de erro.

Figura 2 – Taxa de assimilação líquida de CO₂ [A] (A), eficiência de carboxilação da Rubisco [A/Ci] (B) e condutância estomática [Gs] (C) de três cultivares de arroz (Br/Irga 409, Irga 424 e Irga 425) cultivadas em diferentes concentrações de Fe em solução nutritiva



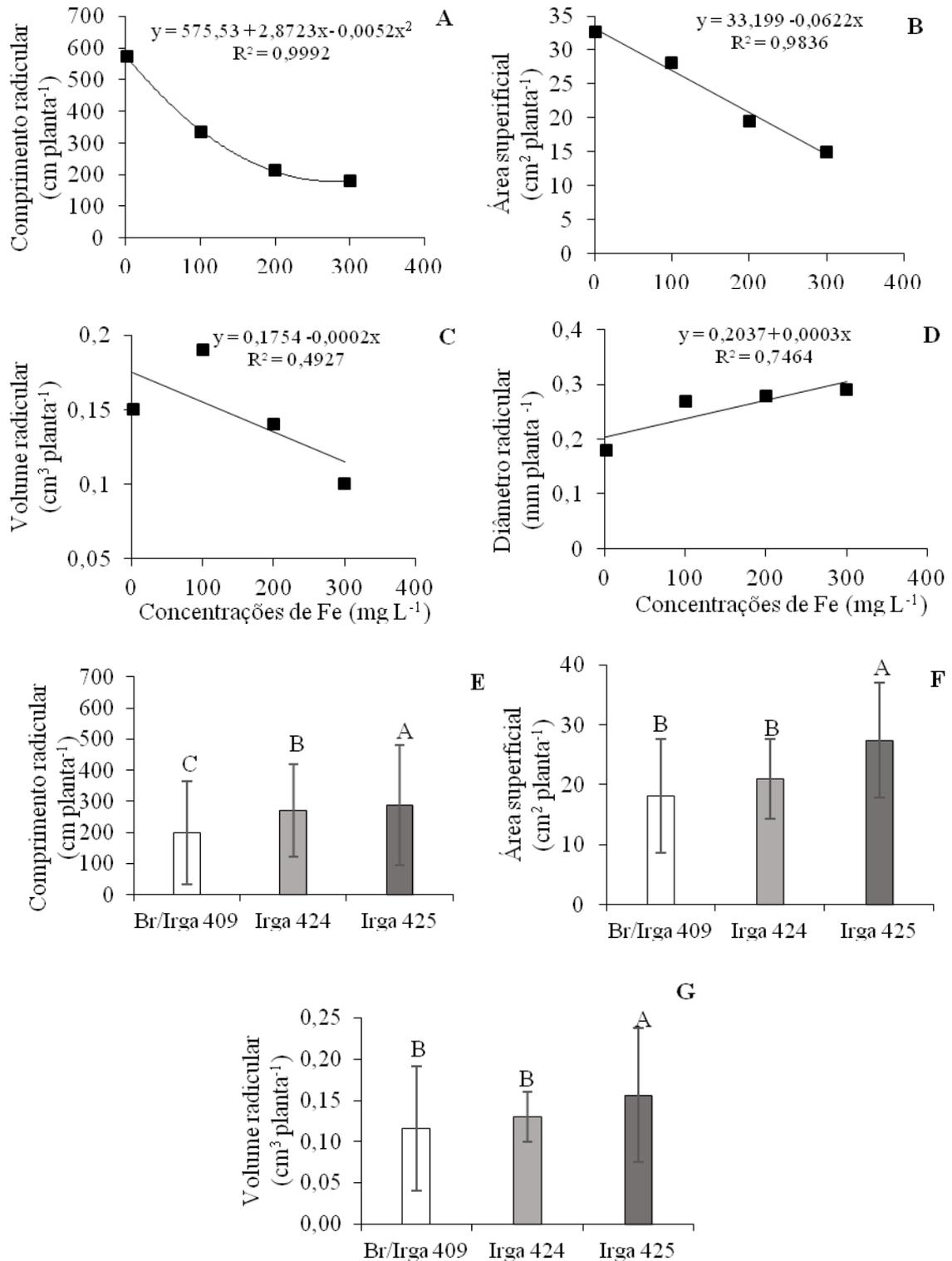
*Cada linha de tendência refere-se à equação ajustada às concentrações de Fe

Figura 3 – Comprimento radicular (A, D), área superficial radicular (B, E), volume radicular (C, F) e diâmetro radicular (G) de três cultivares de arroz (Br/Irga 409, Irga 424 e Irga 425) cultivadas em diferentes concentrações de P em solução nutritiva



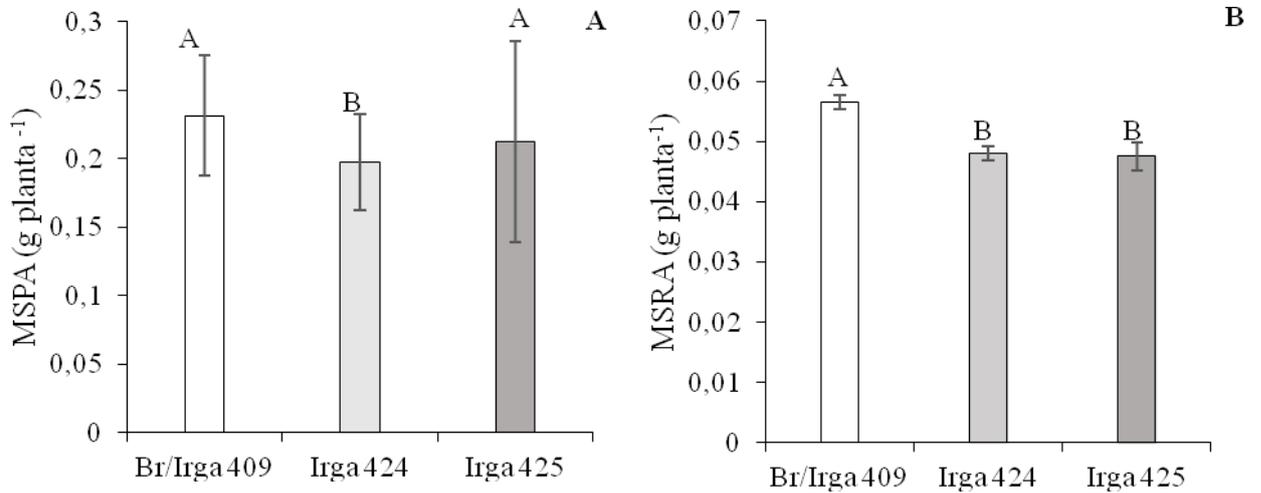
*Cada linha de tendência refere-se à equação ajustada às concentrações de P. **Letras maiúsculas diferentes indicam diferença entre cultivares pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade de erro.

Figura 4 – Comprimento radicular (A, E), área superficial radicular (B, F), volume radicular (C, G) e diâmetro radicular (D) de três cultivares de arroz (Br/Irga 409, Irga 424 e Irga 425) cultivadas em diferentes concentrações de Fe na solução nutritiva



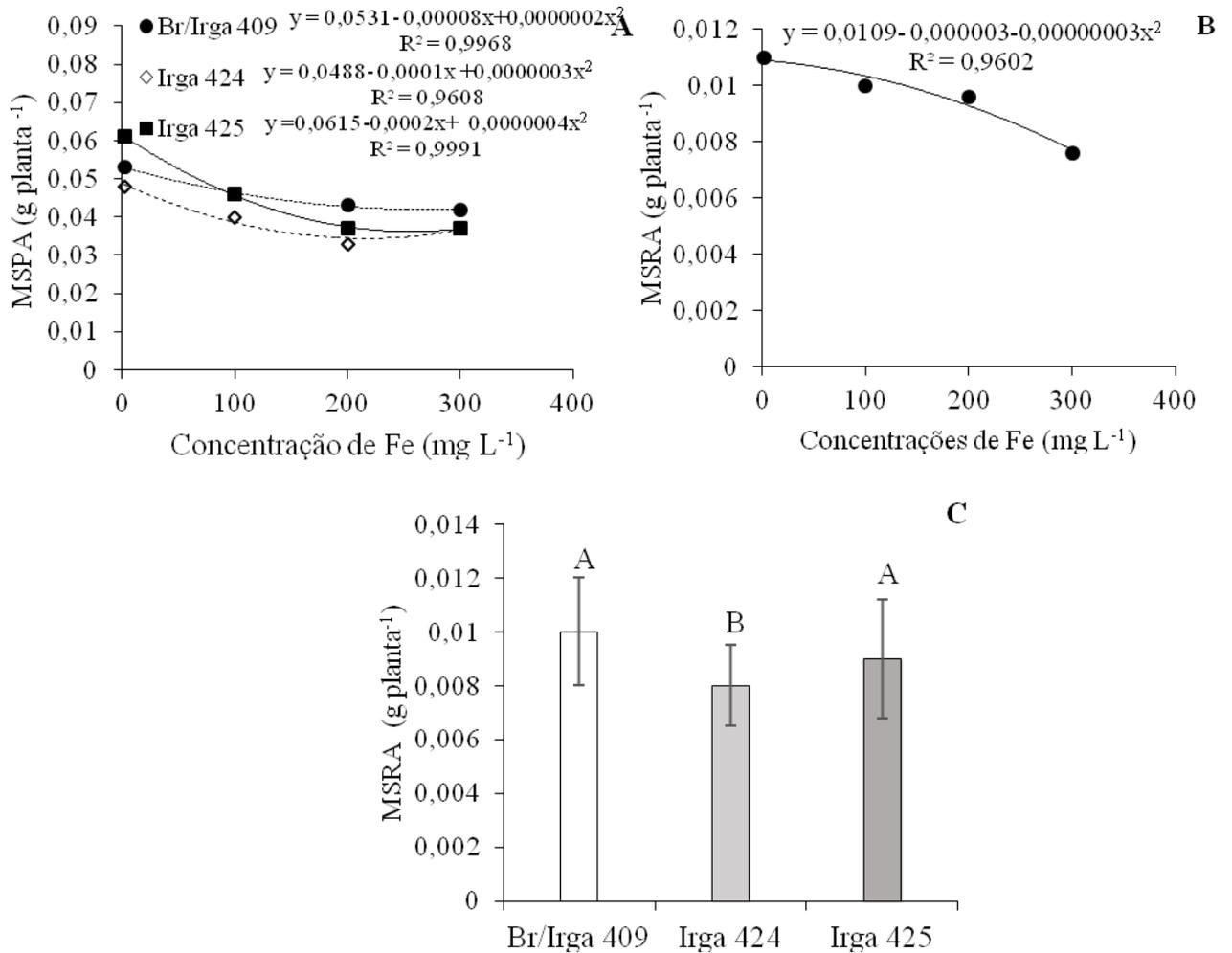
*Cada linha de tendência refere-se à equação ajustada às concentrações de Fe. **Letras maiúsculas diferentes indicam diferença entre cultivares pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade de erro.

Figura 5 – Produção de massa seca de parte aérea [MSPA] (A) e produção de massa seca de raiz [MSR] (B) de três cultivares de arroz (Br/Irga 409, Irga 424 e Irga 425) cultivadas com diferentes concentrações de P na solução nutritiva



*Letras maiúsculas diferentes indicam diferença entre cultivares pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade de erro.

Figura 6 – Produção de massa seca de parte aérea [MSPA] (A) e produção de massa seca de raiz [MSR] (B, C) de três cultivares de arroz (Br/Irga 409, Irga 424 e Irga 425) cultivadas com diferentes concentrações de Fe na solução nutritiva



*Cada linha de tendência refere-se à equação ajustada às concentrações de Fe.

**Letras maiúsculas diferentes indicam diferença entre cultivares pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade de erro.

5. MANUSCRITO 2

EFEITO MITIGADOR DO FÓSFORO NA TOXICIDADE POR FERRO: COMPOSIÇÃO MINERAL E PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA DE CULTIVARES DE ARROZ (*Oryza sativa* L.)

MITIGATOR EFFECT OF PHOSPHORUS IN RICE PLANTS SUBMITTED TO IRON TOXICITY: MINERAL COMPOSITION AND LIPID PEROXIDATION

RESUMO

Objetivou-se caracterizar as respostas nutricionais e extensão do estresse oxidativo em cultivares de arroz após a exposição excessiva ao ferro (Fe), com suprimentos contrastantes de fósforo (P). Três cultivares de arroz (Br/Irga 409, Irga 424, Irga 425), foram expostas ao excesso de Fe (200mg L^{-1}) combinado com as concentrações de P ($2,5$ e 25mg L^{-1}) em solução nutritiva, durante 15 dias. As cultivares Fe-tolerantes (Irga 424 e Irga 425) apresentaram maior concentração de cobre na parte aérea e produção de massa seca de raiz, favorecendo o adequado crescimento em condições de excesso de Fe. O aumento na concentração de P na solução nutritiva reduziu a translocação e concentração de manganês na parte aérea. As cultivares não apresentaram reduções na concentração de clorofila total e carotenoides. Contudo, na baixa concentração de P e excesso de Fe, a Br/Irga 409 e Irga 425 apresentaram aumentos na concentração de malondialdeído na raiz e parte aérea, respectivamente. Com exceção da concentração de Fe e manganês em tecidos da parte aérea, o aumento na concentração de P na solução nutritiva, em condições de excesso de Fe, não influenciou na absorção dos micronutrientes cobre e zinco, porém foi fundamental para reduzir a peroxidação lipídica.

Palavras-chave: Dano oxidativo, Absorção, Nutrição mineral, *Oryza sativa* L.

ABSTRACT

The aim of this study was to characterize the nutritional responses and extension of oxidative stress in rice cultivars after excessive exposure to Fe with contrasting supplies of P. Three rice cultivars (Br/Irga 409, Irga 424, Irga 425) were exposed to excess of Fe (200mg L^{-1}) combined with two concentrations of P ($2,5$, 25mg L^{-1}) in nutrient solution, for 15 days. The Fe-tolerant cultivars (Irga 424, Irga 425) have higher tissue copper (Cu) concentration and root dry mass production, which might favor adequate growth under conditions of excess of Fe. The increase in P concentration in the nutrient solution reduced the translocation and concentration of manganese (Mn) in shoot. The cultivars did not show alteration in the concentration of total chlorophyll and carotenoids. However, at low availability of P and excess of Fe, the Br/Irga 409 and Irga 425 showed increase in lipid peroxidation in shoots and roots, respectively. With exception of the concentration of Fe and Mn in tissues of the shoot, the increase in P in nutrient solution combined with Fe excess, did not influence the absorption of Cu and Zinc, but was essential in reducing the lipid peroxidation.

Key words: Oxidative damage, Absorption, Mineral nutrition, *Oryza sativa* L., Toxicity.

INTRODUÇÃO

Em ambiente aeróbico a absorção do Fe a partir das raízes pode torna-se deficiente, uma vez que este nutriente encontra-se insolúvel na sua forma oxidada (BALK e SCHAEDLER, 2014). Entretanto, em ambientes anaeróbicos, o Fe^{3+} torna-se um elemento redox-ativo e transforma-se em Fe^{2+} que é facilmente disponível aos vegetais (MORRISSEY e GUERINOT, 2009).

Quando em excesso, o Fe^{2+} por estar envolvido em reações de oxi-redução aumentando a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). A participação desse metal ocorre, especialmente, por meio das reações de Fenton e Haber-Weiss: na primeira reação o peróxido de hidrogênio reage com íon Fe^{2+} e é gerado o radical hidroxil, na reação subsequente o Fe^{3+} pode catalisar a reação entre peróxido de hidrogênio e o radical superóxido gerando o radical hidroxil. Este radical potencializa a peroxidação lipídica e oxidação de proteínas (BARBOSA et al., 2010; ROUT et al., 2015).

Adicionalmente, as plantas apresentam várias estratégias para atenuar os problemas acarretados pelo excesso de Fe, tais como: (i) a exclusão de Fe^{2+} ao nível de raiz, por oxidação e formação da placa férrica na rizosfera (CHEN et al., 1980); (ii) o sequestro em vacúolos, apoplasto e proteínas ferritina (AUDEBERT e SAHRAWAT, 2000; MAJERUS et al., 2009); e (iii) detoxificação por ação de enzimas antioxidantes (MAJERUS et al., 2007).

A toxidez por Fe também ocasiona deficiência nutricional múltipla (toxidez indireta ou alaranjamento), por meio de reduções na absorção de nutrientes, especialmente fósforo (P), manganês (Mn), zinco (Zn) e cobre (Cu) (JIANG et al., 2009; SAHRAWAT et al., 2003; ZHANG et al., 1999). Quanto ao P, este desempenha funções de armazenagem de energia, composição de membranas, além de ser constituinte de nucleotídeos e ácidos nucléico (STIGTER e PLAXTON, 2015). Desse modo o P participa de funções essenciais na fotossíntese, respiração e outros processos metabólicos fisiológicos. Existe uma interação antagônica entre o Fe e P, onde o excesso de um nutriente reduz a absorção do outro (MULLER et al., 2015).

Adicionalmente, têm sido observado que vários genótipos diferem na capacidade de tolerar o excesso de Fe (BECKER e ASCH, 2005). Desta forma, no presente trabalho foram comparados três cultivares de arroz, sendo duas tolerantes (Irga 424, Irga 425) e uma sensível (BR-IRGA 409) à toxidez de Fe e sua relação com as respostas à adição de P. O presente estudo foi realizado com objetivo de investigar as respostas nutricionais e extensão do estresse

oxidativo em cultivares de arroz após a exposição excessiva ao Fe, com suprimentos contrastantes de P.

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL VEGETAL E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO

O experimento foi realizado em casa de vegetação localizada no campus da Universidade Federal de Santa Maria, RS. No estudo utilizou-se 3 cultivares de arroz, selecionadas a partir da tolerância a toxidez por Fe: IRGA 425 e IRGA 424 (Fe-tolerante), BR IRGA 409 (Fe-sensível) (SOSBAI 2014). As sementes inicialmente foram umedecidas em água destilada permanecendo a 25°C, no escuro durante 24 horas em placas de petri. Após este período as sementes pré-germinadas foram transferidas para caixas revestidas com papel germiteste parcialmente fechadas, sendo irrigadas com água destilada por 7 dias, em câmaras de crescimento climatizada.

Após 7 dias em água destilada, 15 plântulas foram transferidas para vasos contendo 5 L de solução nutritiva desenvolvida por Yoshida et al. (1976) com pequenas modificações. A solução nutritiva de Yoshida usada para aclimatar as plântulas durante 5 dias teve a seguinte constituição: 40mg L⁻¹ NH₄NO₃, 2,5mg L⁻¹NaH₂PO₄.2H₂O, 40mg L⁻¹K₂SO₄, 40mg L⁻¹CaCl₂, 40mg L⁻¹ MgSO₄. 7H₂O, 0,5mg L⁻¹MnCl₂.4H₂O, 0,05mg L⁻¹ (NH₄)₆.MO₇O₂₄.4H₄O, 0,2mg L⁻¹ H₃BO₃, 0,01mg L⁻¹ZnSO₄.7H₂O, 0,01mg L⁻¹ CuSO₄. 5H₂O, 2mg L⁻¹ EDTA-Fe₂SO₄.7H₂O. .

Após o período de aclimação as plantas foram expostas ao excesso de +Fe (200 mg L⁻¹) combinado com diferentes concentrações de P (2,5 e 25mg L⁻¹). A concentração e a disponibilidade do Fe e P na solução nutritiva foram estimadas usando o software Visual Minteq, os resultados da especiação iônica encontram-se na Tabela 1.

Os tratamentos foram dispostos em esquema fatorial 3x2, sendo três cultivares (Br/Irga 409, Irga 424 e Irga 425) e duas concentrações de P (2,5 e 25mg L⁻¹), com três repetições. As soluções foram renovadas a cada 4 dias e o pH ajustado em 5,6± 0.1 pela adição de NaOH ou HCl 0,1mol L⁻¹. As determinações das variáveis (biométricas de crescimento, nutricionais e bioquímicas) foram obtidas 10 dias após a aplicação dos tratamentos.

VARIÁVEIS ANALISADAS

Componentes biométricos de crescimento

Após o período de 10 dias da aplicação dos tratamentos de Fe e P, cinco plantas de cada repetição foram separadas em parte aérea e raízes, para determinação dos componentes biométricos de crescimento: número de folhas, número de perfilhos e altura de plantas. Em seguida foram colocadas em sacos de papel e submetidas à secagem em estufa, com ventilação forçada a 65°C, durante 48 horas, para determinação da produção de matéria seca de raízes (MSR) e de parte aérea (MSPA), por meio de pesagem em balança de precisão.

Análise nutricional dos tecidos

Após pesagem, as amostras foram submetidas a uma digestão nítrico-perclórico e foram determinadas as concentrações de P e concentrações dos micronutrientes [Fe, Zn, Cu e Mn] (CARMO et al., 2000). As translocações dos nutrientes [Zn, Cu, Mn, Fe e P] foram quantificadas de acordo com a metodologia de Shaibur et al. (2013):

$$\text{Translocação de nutrientes (\%)} = \frac{\text{Acúmulo de nutrientes na parte aérea}}{\text{Acúmulo total de nutrientes}} \times 100$$

Variáveis bioquímicas

Para as variáveis fisiológicas foram utilizadas 10 plantas de cada repetição, as quais foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido, seguida de armazenamento em temperatura -80°C.

As concentrações dos pigmentos (clorofilas e carotenoides) foram estimados seguindo o método de Hiscox e Israelsstam (1979) e calculado de acordo com Lichtenthaler (1987). Utilizou-se 0,05g de material fresco para a determinação. As amostras frescas das folhas foram incubadas a 65°C em dimetilsulfóxido (DMSO) até os pigmentos serem completamente removidos. Para a determinação da clorofila a, b e carotenoides, a absorvância da solução foi medida em 663 e 645 e 470 nm, respectivamente, utilizando um espectrofotômetro.

A peroxidação lipídica foi estimada através dos danos celulares pelo do acúmulo de malondialdeído (MDA) como produto final da peroxidação lipídica, pela reação com ácido

tiobarbitúrico (TBA), de acordo com El-Moshaty et al. (1993). Foi homogeneizado 0,5g de amostra em 4ml de tampão fosfato citrato TFK 0,2 M pH 6,5, após as amostras foram centrifugadas em centrífuga refrigerada a 4°C durante 15min, 20000g. Para a determinação de MDA, alíquotas 1,5 ml da fração do sobrenadante foi adicionado a um volume igual de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,5% (p/v) e ácido tricloroacético (TCA) 20% (p/v) e incubadas em banho-maria a 95°C por 40 minutos. A reação foi paralisada em banho de gelo por 15 minutos. Após centrifugação a 10000g durante 5 min, em seguida foi determinada a absorbância a 532nm, descontando-se a absorbância inespecífica a 600 nm.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade de erro, com auxílio do programa estatístico ASSISTAT.

RESULTADOS

Para as variáveis biométricas de crescimento, altura de plantas, número de folhas, número de perfilhos e produção de MSPA, não houve interação entre os fatores cultivares e concentrações de P. Independente das concentrações de P utilizadas na solução nutritiva, as cultivares Fe-tolerantes (Irga 424 e Irga 425) apresentaram maiores valores de produção de MSR em relação a cultivar Fe-sensível (Br/Irga 409) (Tabela 2).

A interação do excesso de Fe com as concentrações contrastantes de P causou diferentes respostas nas concentrações de todos os nutrientes estudados nos diferentes órgãos das plantas (Figura 1 e 2). A concentração de Fe nos tecidos de parte aérea foi afetada pelo fator isolado das concentrações de P na solução nutritiva. O aumento na concentração de P (25mg L⁻¹) ocasionou um decréscimo significativo na concentração de Fe nos tecidos de parte aérea das plantas (Figura 1A).

A concentração de Fe nos tecidos de raízes apresentou resposta a interação entre os fatores cultivares x concentrações de P (Figura 2A). A cultivar Irga 424, quando submetida ao excesso de Fe associado e baixa concentração de P (2,5mg L⁻¹), apresentou maior concentração de Fe nos tecidos de raízes do que as demais cultivares (Figura 2A). Por outro lado, com aumento na concentração de P (25mg L⁻¹), a cultivar Irga 424 apresentou menor concentração de Fe em relação as outras duas cultivares. A cultivar Irga 424 foi a única que

apresentou redução (32,70%) na concentração de Fe nas raízes pelo aumento na concentração de P na solução nutritiva (Figura 2A).

A concentração de P nos tecidos de parte aérea respondeu ao aumento na concentração de P na solução nutritiva, com incremento de 55% na concentração do nutriente no tecido (Figura 1B). A concentração de P nos tecidos de raízes foi afetada pela interação dos fatores cultivares x concentrações de P (Figura 2B). Verificou-se que as cultivares Br/Irga 409 e Irga 425 apresentaram maiores concentrações de P em tecidos de raízes do que a cultivar Irga 424. No excesso de Fe (200mg L^{-1}), as três cultivares mostraram maior concentração de P nas raízes com o aumento da concentração de P (25mg L^{-1}) na solução nutritiva (Figura 2B).

A concentração de Zn na parte aérea variou de acordo com o fator isolado das cultivares, sendo que a cultivar Irga 425 apresentou maior valor do que as outras duas cultivares (Figura 1C). A concentração de Zn na raiz não foi afetada por nenhum dos fatores estudados (Figura 2C e 2D).

Já a concentração de Cu em tecidos de parte aérea (Figura 1D) e raízes (Figura 2E) variou de acordo com o fator isolado de cultivares e concentrações de P utilizadas na solução nutritiva, respectivamente. A concentração de Cu na parte aérea foi menor na cultivar Br/Irga 409 do que nas cultivares Irga 424 e Irga 425, as quais não diferiram entre si (Figura 1D). O excesso de Fe associado ao aumento na concentração de P, reduziu a concentração de Cu nas raízes (Figura 2E).

A concentração de Mn nos tecidos de parte aérea (Figura 1E) e raízes (Figura 2 G) apresentaram respostas à interação entre os fatores cultivares x concentrações de P. Na baixa concentração de P ($2,5\text{mg L}^{-1}$), a cultivar Irga 425 apresentou maior concentração de Mn na parte aérea do que as cultivares Br/Irga 409 e Irga 424. Por outro lado, com aumento na concentração de P (25mg L^{-1}) as cultivares não diferiram significativamente entre si. A cultivar Irga 425 foi a única que reduziu a concentração de Mn no tecido de parte aérea com aumento na concentração de P na solução nutritiva (Figura 1E).

Independente das concentrações de P, a cultivar Irga 425 apresentou maior concentração de Mn nas raízes. Com aumento na concentração de P (25mg L^{-1}) a cultivar Br/Irga 409 foi a única que apresentou incremento na concentração de Mn nas raízes, quando comparada às plantas submetidas a baixa concentração de P ($2,5\text{mg L}^{-1}$) (Figura 2G).

Em condições de excesso de Fe e independente das concentrações de P as cultivares de arroz não alteraram a translocação dos micronutrientes (Fe, Cu e Zn) e do P. Por outro lado, a translocação de Mn para a parte aérea reduziu com aumento na concentração de P na solução nutritiva (Tabela 3).

Quanto à concentração de pigmentos (clorofila total e carotenoides) não houve resposta a interação entre os fatores (Figura 3A e 3B). No entanto, a concentração de MDA nos tecidos de parte aérea (Figura 3C) e de raízes (Figura 3D) apresentaram respostas a interação entre os fatores cultivares e concentrações de P. A concentração de MDA na parte aérea somente diferiu entre as cultivares na baixa concentração de P ($2,5\text{mg L}^{-1}$). Nessa condição, a cultivar Irga 425 apresentou maior concentração de MDA na parte aérea do que as outras duas cultivares. O aumento na concentração de P (25mg L^{-1}) reduziu em 45,26% a concentração de MDA na parte aérea da cultivar Irga 425 (Figura 3C).

No excesso de Fe associado a baixa concentração de P, a cultivar Br/Irga 409 apresentou maior concentração de MDA nas raízes do que as demais cultivares. No entanto, com aumento na concentração de P na solução nutritiva, a cultivar Br/Irga 409 foi a única que reduziu a concentração de MDA nas raízes (Figura 3D).

DISCUSSÃO

Para identificar as respostas das três cultivares em relação ao excesso de Fe e os possíveis efeitos da interação com a nutrição fosfatada foram quantificados a concentração de P e de quatro micronutrientes, as concentrações de pigmentos, a peroxidação lipídica e vários componentes biométricos de crescimento, os quais estão fortemente relacionados aos efeitos da toxidez por Fe em plantas.

As plantas submetidas a 200mg L^{-1} de Fe apresentaram valores médios de concentrações de Fe nos tecidos de $374,02$ a 553mg kg^{-1} na parte aérea (Figura 1A) e $11.211,16$ a $12.541,06\text{mg kg}^{-1}$ nas raízes (Figura 2A). Stein et al. (2014) relataram que no excesso de Fe houve aumento acentuado no acúmulo deste nutriente nas raízes e parte aérea de plantas de arroz, com diferentes respostas entre as cultivares estudadas.

Após absorvido pelas raízes, o Fe pode ser transportado à parte aérea via xilema através da corrente transpiratória (MORRISSEY e GUERINOT, 2009) ou, devido às altas concentrações deste nutriente no meio de crescimento, poderá ocorrer a oxidação do Fe na rizosfera (BECKER e ASCH, 2005), ocasionando a precipitação de óxidos de Fe (WEISS et al., 2005). Consequentemente, essa precipitação causa a formação de um depósito de placa na superfície radicular, de coloração alaranjada (CHEN et al., 2006).

Além do Fe retido na rizosfera, este pode ser retido também no apoplasto onde é adsorvido aos sítios de ligação com cargas negativas da parede da celular (SATTELMACHER, 2010). Desta forma, o incremento na concentração de Fe total nas raízes

(Figura 2A) em detrimento à concentração de Fe na parte aérea, possivelmente deve-se não só ao acúmulo intra e extracelular, mas também ao retido na rizosfera por meio da formação da placa férrica.

Segundo Fageria (1984) os níveis críticos de P em plantas de arroz encontram-se na faixa de 0,15-0,25%. No presente estudo, verificou-se na parte aérea em média valores de 0,25%, quando as plantas foram submetidas a baixa concentração de P e excesso de Fe, demonstrando valores próximos daqueles considerados críticos para o adequado crescimento do arroz (Figura 1B). Muller et al. (2015) observaram incrementos na expressão de transportadores de fosfato OsPII quando cultivares de arroz foram submetidas a solução com excesso de sulfato de Fe. Desta forma, o suprimento adequado de P à planta pode minimizar os efeitos ocasionados pelo excesso de Fe.

O incremento na concentração de P nas raízes (Figura 2B) se deve a retenção pela camada de óxidos de Fe nas raízes, ou mesmo devido a acidificação da rizosfera. Os H⁺ liberados na rizosfera podem ser produzidos para equilibrar o excesso de cátions sobre a absorção de ânions ou mesmo devido o processo de redução de Fe²⁺ a Fe³⁺ (ROSE et al., 2013). Em condições de excesso de Fe, na presença de alta concentração de P na solução nutritiva, a cultivar Irga 424 apresentou menor concentração de Fe nas raízes (Figura 2A). Liu et al. (2004) observaram incrementos de 10-25 vezes na formação da placa férrica quando as plantas foram cultivadas em solução com baixo P (ausência do nutriente).

Como esperado, as concentrações de Fe nos tecidos de parte aérea encontraram-se acima dos valores críticos de toxidez Fe > 300mg kg⁻¹ (DORBEMAN e FAIRHUST, 2000), os quais são indicados para plantas mais velhas durante o crescimento vegetativo (perfilhamento) (Figura 1A). Em relação aos demais micronutrientes estudados, estes encontravam-se dentro da faixa adequada para o crescimento do arroz (Figura 1C, 1D e 1E). De acordo com Fageria (1984), as concentrações adequadas para o Cu, Mn e Zn são de 5-20, 30-600 e 20-150mg kg⁻¹, respectivamente.

No excesso de Fe e baixa concentração P, a cultivar Irga 425 obteve maior concentração de Mn na parte aérea em relação as demais cultivares. No entanto, com aumento na concentração de P na solução nutritiva, a cultivar reduziu em 43% a concentração de Mn na parte aérea (Figura 1E). Adicionalmente, todas as cultivares reduziram a translocação de Mn para parte aérea com o incremento da concentração de P na solução nutritiva (Tabela 3). Pedas et al. (2011) estudando a interação dos nutrientes P e Mn em plantas de cevada, verificaram redução na absorção de Mn que variava de 75% na concentração de 150µM de P para completa ausência na absorção do nutriente com a adição de 500µM de P. De acordo

com os mesmos autores, essa interação negativa pode induzir deficiência de Mn, refletindo em reduções na produção.

Independente das concentrações de P utilizadas, a cultivar Irga 425 apresentou maior concentração de Zn na parte aérea (Figura 1C). Além disso, as cultivares Fe-tolerantes (Irga 424 e Irga 425) apresentaram maior produção de MSR (Tabela 2) e maior absorção de Cu do que a cultivar sensível (Br/Irga 409) (Figura 1D). O alagamento em sistema de cultivo de arroz irrigado é realizado aos 20 dias após o plantio (estágio V4), onde o processo de liberação de Fe na forma reduzida Fe^{2+} torna-se mais intenso devido ao processo de redução do solo (SCHMIDT, 2010). Desta forma, o incremento na concentração de Zn (Figura 1C) e Cu (Figura 1D) nos tecidos nos estágios iniciais, podem minimizar distúrbios nutricionais durante o período de toxidez por Fe.

O excesso de Fe associado com diferentes concentrações de P nas folhas não ocasionou redução na concentração de clorofila total e carotenoides (Figura 3A e 3B). Esses resultados podem ser uma indicação que, devido período de exposição ao excesso de Fe, os danos não atingiram o aparato fotossintético.

O malondialdeído (MDA) é um dos produtos finais da peroxidação oxidativa dos lipídios (SHARMA et al., 2001). Neste contexto, a cultivar Irga 425 e Br/Irga 409 apresentaram aumento na peroxidação lipídica na parte aérea (Figura 3C) e nas raízes (Figura 3D) em condição com $2,5\text{mg L}^{-1}$ de P e excesso de Fe, respectivamente. Resultados semelhantes foram observados por Fang et al. (2001) onde o excesso de $FeSO_4$ induziu o aumento na concentração de MDA. A estrutura química do Fe e sua capacidade para conduzir reações redox torna-o um importante elemento na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) em sistemas biológicos, ocasionando aumento na peroxidação lipídica. As cultivares Br/Irga 409 e Irga 425 reduziram a concentração de MDA na parte aérea (Figura 3C) e raízes (Figura 3D) com aumento na concentração de P na solução nutritiva. Xiao-Hua et al. (2003) destacam que plantas submetidas à baixa concentração de P podem apresentar aumento na concentração de MDA pela formação de EROs. Porém de acordo com os mesmos autores, as cultivares de arroz tolerantes a baixo P apresentaram menores conteúdo de MDA.

CONCLUSÕES

As cultivares Fe-tolerantes (Irga 424 e Irga 425) apresentam maior concentração de Cu na parte aérea e produção de massa seca de raiz, favorecendo o adequado crescimento em condições de excesso de Fe.

O aumento na concentração de P na solução nutritiva reduziu a concentração de Fe nos tecidos de parte aérea e raízes, bem como foi significativamente importante para minimizar a peroxidação lipídica, evidenciando sua importância como mitigador da toxidez de Fe em plantas de arroz.

O aumento na concentração de P na solução nutritiva reduziu a translocação e concentração de Mn na parte aérea.

REFERÊNCIAS

AUDEBERT, A.; SAHRAWAT, K. L. Mechanisms for iron toxicity tolerance in lowland rice. **J. Plant Nutr.** v. 23, p. 1877-1885, 2000. DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/01904160009382150>.

BALK, J.; SCHAEDLER, T. A. Iron cofactor assembly in plants. **Annu. Rev. Plant Biol.** v. 65, p. 125–153, 2014. DOI: 10.1146050213-035759.

BARBOSA, K. B. F. et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição.** v. 23, p. 629-643, 2010. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1415-52732010000400013>.

BECKER, M.; ASCH, F. Iron toxicity in rice: Conditions and management concepts. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science.** v. 168, n. 4, p. 558–573, 2005. DOI:10.1002/jpln.200520504.

CHEN C. C.; DIXON, J. B.; TURNER F. B. Iron coatings on rice leaves: Morphology and models of development. **Soil Sci. Soc. Am. J.** v. 44, p. 1113-1119, 1980. doi:10.2136/sssaj1980.03615995004400050046x.

CHEN, R. F. et al. Response of rice (*Oryza sativa*) with root surface iron plaque under aluminium stress. **Annals of Botany.** v. 98, p. 389–395, 2006. DOI: 10.1093/aob/mcl110.

CARMO, C.A.F.S. et al. Métodos de análise de tecidos vegetais utilizados na Embrapa Solos. Rio de Janeiro, Embrapa Solos, 2000. 41p. (Embrapa Solos. Circular Técnica, 6).

EL-MOSHATY, et al. Lipid peroxidation and superoxide production in cowpea (*Vigna unguiculata*) leaves infected with tobacco ringspot virus or southern bean mosaic virus. **Physiological and Molecular Plant Pathology**. v. 43, p. 109-119, 1993. DOI: <https://doi.org/10.1006/pmpp.1993.1044>.

DOBERMANN, A.; FAIRHURST, T. **Rice: nutrient disorders and nutrient management**. Manila: International Rice Research Institute, 2000. 203 p.

FANG, W.C.; WANG, J.W.; LIN, C.C.; KAO, C.H. Iron induction of lipid peroxidation and effects on antioxidative enzyme activities in rice leaves. **Plant Growth Regulation**. v. 35, p. 75–80, 2001.

FAGERIA, N. K. **Adubação e nutrição mineral da cultura de arroz**. Rio de Janeiro: Campus; Goiânia: EMBRAPA-CNPAP, 1984. 341 p.

HISCOX, J. D.; ISRAELSTAM, G. F. A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. **Canadian Journal of Botany**. v. 57, p. 1132-1334, 1979. DOI: <https://doi.org/10.1139/b79-163>.

JIANG, F.Y; CHEN, X.; LUO, A. C. Iron plaque formation on wetland plants and its influence on phosphorus, calcium and metal uptake. **Aquatic Ecology**. v. 43, p. 879–890, 2009.

LIU, W. J. et al. Do phosphorus nutrition and iron plaque alter arsenate (As) uptake by rice seedlings in hydroponic culture? **New Phytologist**. v. 162, p. 481–488, 2004. DOI:10.1111/j.1469-8137.2004.01035.

LI, Y. F. et al. Genotypic variation of rice in phosphorus acquisition from Iron Phosphorus: contributions of root morphology and phosphorus uptake kinetics. **Journal of Plant Physiology**. v. 5, p. 230-238, 2007.

LICHTENTHALER, H. K. Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. **Methods Enzymol**. v. 148, p. 50–382, 1987. DOI: [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(87\)48036-1](https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)48036-1).

MULLER C. et al. Differential physiological responses in rice upon exposure to excess distinct iron forms. **Plant and Soil**. v. 391, p. 123–138, 2015.

MAJERUS, V.; BERTIN, P.; LUTTS, S. Effects of iron toxicity on osmotic potential, osmolytes and polyamines concentration in the African rice (*Oryza glaberrima* Steud). **Plant Sci**. v. 173, p. 96–105, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2007.04.003>.

MAJERUS, V.; BERTIN, P.; LUTTS, S. Abscisic acid and oxidative stress implications in overall ferritin synthesis by African rice (*Oryza glaberrima* Steud.) seedlings exposed to short term iron toxicity. **Plant Soil**. p. 324-253, 2009. DOI: <http://www.nal.usda.gov/>.

MORRISSEY, J.; GUERINOT, M. L. Iron uptake and transport in plants: The good, the bad, and the ionome. **Chem Rev**. v. 109, p. 4553–4567, 2009. DOI: 10.1021/cr900112r.

PEREIRA, E. G. et al. Tropical rice cultivars from lowland and upland cropping systems differ in iron plaque formation. **Journal of Plant Nutrition**. v. 37, p. 1373-1394, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/01904167.2014.888744>.

PEDAS, P. et al. Elevated phosphorus impedes manganese acquisition by barley plants. **Front. Plant Sci**. v. 2, p. 37, 2011. DOI: 10.3389/fpls.2011.00037.

ROSE, T. J. et al. Enhancing phosphorus and zinc acquisition efficiency in rice: A critical review of root traits and their potential utility in rice breeding. **Annals of Botany**. v. 112, p. 331–345, 2013. DOI: 10.1093/aob/mcs217.

ROUT, G. R.; SAHOO, S. Role of iron in plant growth and metabolism. **Reviews in Agricultural Science**. 2015; 3: 1-24.

SATTELMACHER, B. The apoplast and its significance for plant mineral nutrition. **New Phytologist**. v. 149, p. 167–192, 2010. DOI: 10.1046/j.1469-8137.2001.00034.

SCHMIDT, F. et al. Impacto do manejo da água na toxidez por ferro no arroz irrigado por alagamento. **Ci. Solo**. v. 37, p. 1226–1235, 2010. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-06832013000500012>.

SHARMA, P. et al. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. **Journal of Botany**. v. 2012, p. 1–26, 2001. DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2012/217037>.

SHAIBUR, M. R.; ADJADEH, T. A.; KAWAI, S. Effect of phosphorus on the concentrations of arsenic, iron and some other elements in barley grown hydroponically. **J. Soil Sci. Plant Nutr**. v. 13, p. 87–98, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-95162013005000009>.

STIGTER, K. A.; PLAXTON, W. C. Molecular mechanisms of phosphorus metabolism and transport during leaf senescence. **Plants**. v. 4, p. 773-798, 2015. DOI:10.3390/plants4040773.

SOSBAI. **Arroz Irrigado: Recomendações técnicas da pesquisa para o sul do Brasil**. Bento Gonçalves, RS, 2014. 192p.

STEIN, R. J.; LOPES, S. I. G; FETT, J. P. Iron toxicity in field-cultivated rice: Contrasting tolerance mechanisms in distinct cultivars. **Theoretical and Experimental Plant Physiology**. v. 26, p. 135–146, 2014.

SHARAWAT, K. L. Iron toxicity in wetland rice: occurrence and management through integration of genetic tolerance with plant nutrition. **Journal of the Indian Society of Soil Science**. v. 5, p. 409-417, 2003.

WEISS, J.V.; EMERSON, D.; MEGONIGAL, J. P. Rhizosphere Iron (III) deposition and reduction in a l.-dominated wetland. **Soil Science Society of America Journal**. v. 69, p. 1861, 2005. DOI: <https://doi.org/10.2136/sssaj2005.0002>.

YOSHIDA, S. et al. **Laboratory manual for physiological studies of rice**. Philippines: The International Rice Research Institute, 1976. 82p.

ZHANG, X.; ZHANG, F.; MAO, D. Effect of iron outside roots on nutrient uptake by rice (*Oryza sativa* L.): phosphorus uptake. **Plant and Soil**. v. 209, p. 187-192, 1999.

XIAO, H. et al. Effects of low-phosphorus stress on membrane lipid peroxidation and protective enzyme activities in leaves of different rice (*Oryza sativa* L.) cultivars. **Rice Science**. v. 11, p. 43-46. 2003.

Tabela 1 – Concentrações e disponibilidade de Fe e P na solução nutritiva estimadas pelo software VISUAL MINTEQ

| Tratamentos | | Disponibilidade de Fe na solução nutritiva | Disponibilidade de P na solução nutritiva |
|-----------------------------------|-----|---|--|
| Fe | P | | |
| ----- (mg L ⁻¹) ----- | | ----- % ----- | |
| 200 | 2,5 | 97 | 41 |
| 200 | 25 | 87 | 44 |

Tabela 2 – Componentes biométricos de crescimento [altura de plantas, número de folhas, número de perfilhos, produção de massa seca de parte aérea (MSPA) e massa seca de raiz (MSR)] de cultivares de arroz (Br/Irga 409, Irga 424 e Irga 425) cultivadas sob excesso de +Fe (200mg L⁻¹) combinado com P (2,5mg L⁻¹) e +P (25mg L⁻¹) em solução nutritiva

| Componentes biométricos de crescimento | | | | | |
|--|---------|-------------------------|-------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Tratamentos | Altura | N° de folhas | N° de | MSPA | MSR |
| --- Fe (200mg L ⁻¹)--- | (cm) | (planta ⁻¹) | perfilhos | (g planta ⁻¹) | (g planta ⁻¹) |
| | | | (planta ⁻¹) | | |
| P (2,5mg L ⁻¹) | 19,02 a | 3,91 a | 0,77 a | 0,053 a | 0,011 a |
| +P (25mg L ⁻¹) | 18,73 a | 3,52 a | 0,94 a | 0,055 a | 0,012 a |
| Cultivares | | | | | |
| Br/Irga 409 | 19,38 a | 3,58 a | 0,87 a | 0,055 a | 0,0093 b |
| Irga 424 | 19,29 a | 3,75 a | 0,83 a | 0,058 a | 0,0132 a |
| Irga 425 | 18,96 a | 3,83 a | 0,87 a | 0,050 a | 0,0119 a |
| CV (%) | 11,97 | 13,98 | 15,87 | 15,85 | 11,50 |

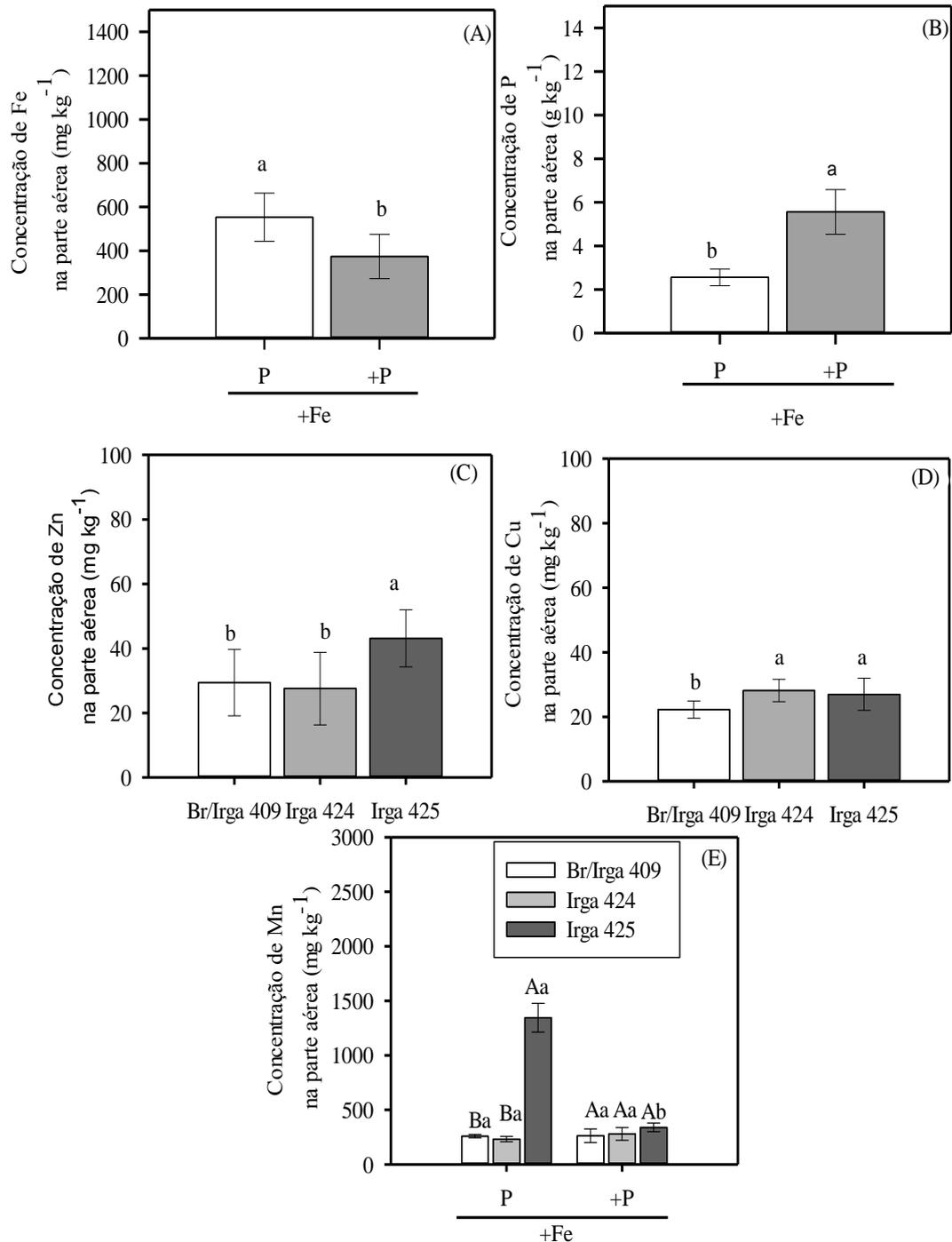
Médias seguidas por letras diferentes em cada coluna diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade do erro.

Tabela 3 – Translocação de nutrientes (fósforo, ferro, zinco, cobre e manganês) de cultivares de arroz (Br/Irga 409, Irga 424 e Irga 425) cultivadas sob excesso de Fe combinado com P (2,5mg L⁻¹) e +P (25mg L⁻¹) em solução nutritiva

| Translocação de nutrientes | | | | | |
|-------------------------------------|--------------|--------|--------|--------|----------|
| Tratamentos | Fósforo | Ferro | Zinco | Cobre | Manganês |
| --- Fe (200mg L ⁻¹) --- | -----% ----- | | | | |
| P (2,5mg L ⁻¹) | 17,94a | 87,56a | 40,68a | 76,85a | 98,61a |
| +P (25mg L ⁻¹) | 14,07a | 83,79a | 39,46a | 81,94a | 97,40b |
| Cultivares | | | | | |
| Br/Irga 409 | 19,22a | 86,69a | 44,26a | 80,23a | 97,87a |
| Irga 424 | 13,25a | 85,86a | 32,13a | 81,55a | 97,93a |
| Irga 425 | 15,53a | 84,47a | 43,84a | 76,40a | 98,22a |
| CV (%) | 24,16 | 5,44 | 35,28 | 8,53 | 2,22 |

Médias seguidas por letras diferentes em cada coluna diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade do erro.

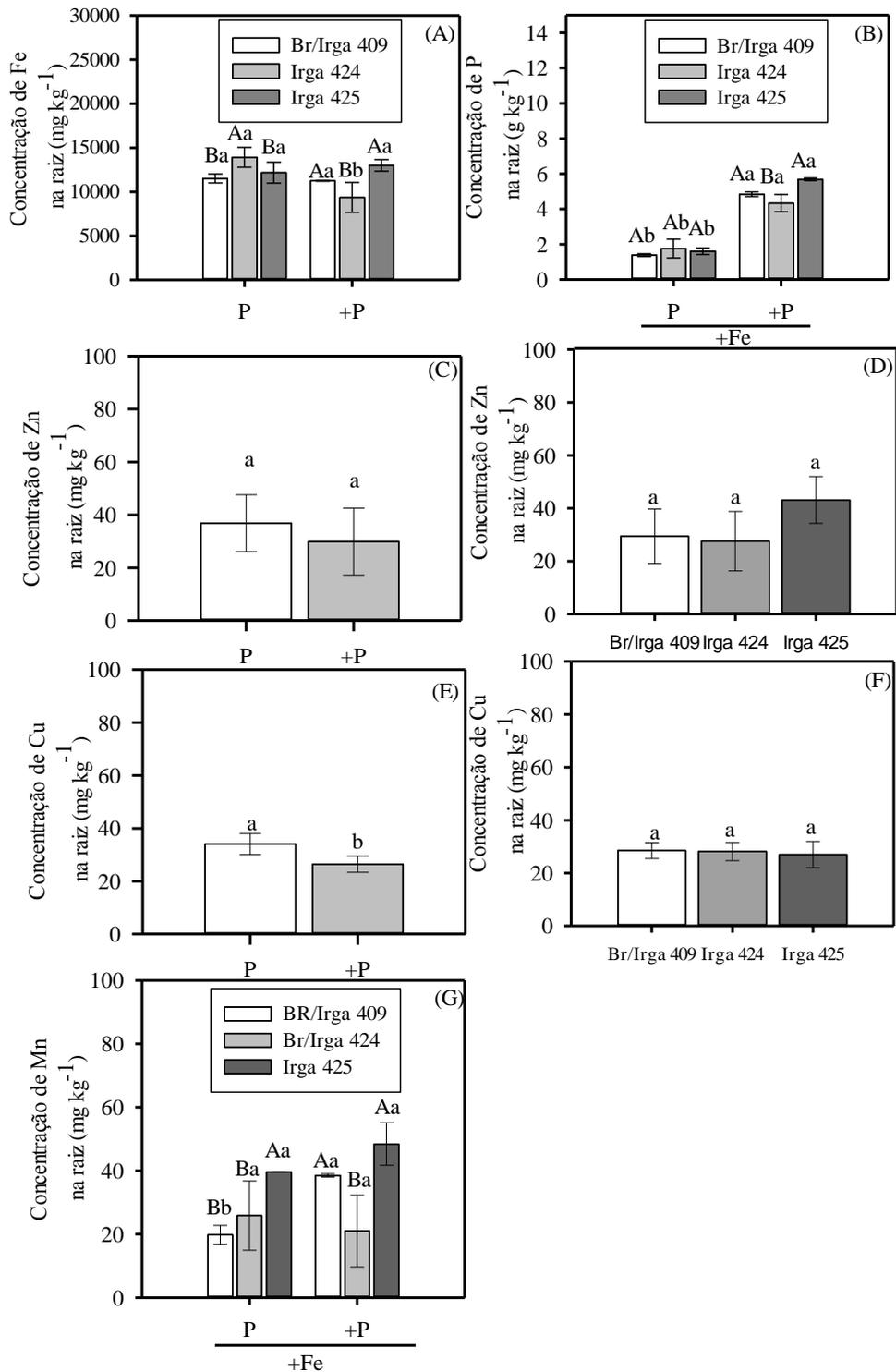
Figura 1 – Concentrações de nutrientes (P, Fe, Zn, Cu e Mn) no tecido de parte aérea de três cultivares de arroz (Br/Irga 409, Irga 424 e Irga 425) cultivadas sob excesso de +Fe (200mg L^{-1}) combinado com P ($2,5\text{mg L}^{-1}$) e +P (25mg L^{-1}) em solução n



*

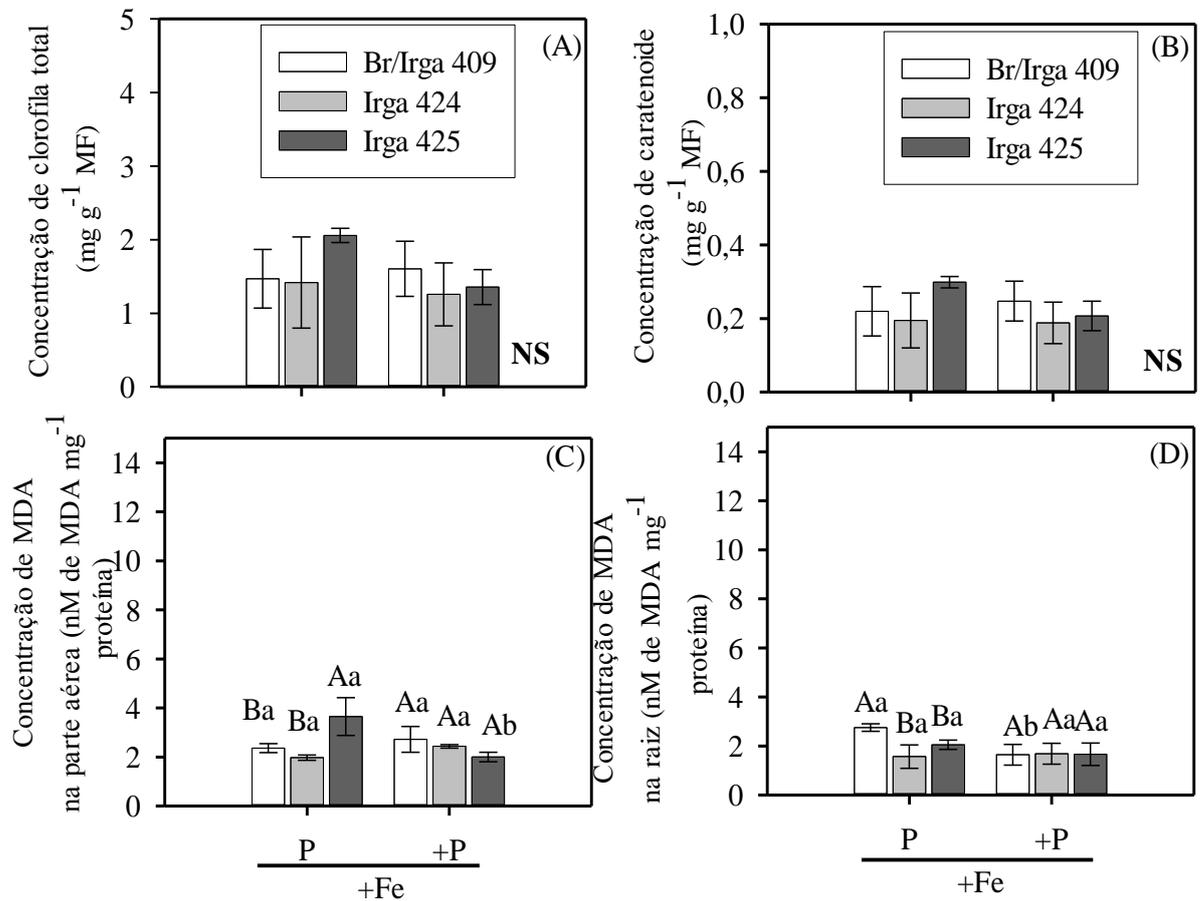
Médias seguidas por letras diferentes diferem significativamente pelo teste Scott Knott a 5% de probabilidade do erro. Letra maiúscula compara as cultivares entre si em um mesmo tratamento. Letra minúscula compara a mesma cultivar em diferentes concentrações de P ($2,5\text{mg L}^{-1}$) e +P (25mg L^{-1}).

Figura 2 – Concentrações de nutrientes (P, Fe, Zn, Cu e Mn) no tecido de raiz de três cultivares de arroz cultivadas sob excesso de +Fe (200mg L⁻¹) combinado com P (2,5mg L⁻¹) e +P (25mg L⁻¹) em solução nutritiva



*Médias seguidas por letras diferentes diferem significativamente pelo teste Scott Knott a 5% de probabilidade do erro. Letra maiúscula compara as cultivares entre si em um mesmo tratamento. Letra minúscula compara a mesma cultivar em diferentes concentrações de P (2,5mg L⁻¹) e +P (25mg L⁻¹).

Figura 3 – Concentração de clorofila total (A), concentração de carotenoides (B), concentração de malondialdeído (MDA) na parte aérea (C) e na raiz (D) de três cultivares de arroz (Br/Irga 409, Irga 424 e Irga 425) cultivadas sob excesso de +Fe (200mg L⁻¹) combinado com P (2,5mg L⁻¹) e +P (25mg L⁻¹) em solução nutritiva



*Médias seguidas por letras diferentes diferem significativamente pelo teste Scott Knott a 5% de probabilidade do erro. ^{NS} Não houve diferença significativa. Letra maiúscula compara as cultivares entre si em um mesmo tratamento. Letra minúscula compara a mesma cultivar em diferentes concentrações de P (2,5mg L⁻¹) e +P (25 mg L⁻¹).

6. MANUSCRITO 3

RESPOSTAS MORFOMÉTRICAS DE RAÍZES E EFICIÊNCIA DE USO DE FÓSFORO DE CULTIVARES DE ARROZ (*Oryza sativa* L.) CULTIVADAS SOB EXCESSO DE FERRO

MORPHOMETRIC ROOT RESPONSES AND EFFICIENCY OF PHOSPHORUS USE OF RICE CULTIVARS (*Oryza sativa* L.) CULTIVATED UNDER EXCESS OF IRON

RESUMO

O excesso de ferro (Fe) é um importante fator que reduz a produtividade do arroz em condições de solos alagados. Objetivou-se caracterizar as respostas de três cultivares de arroz (*Oryza sativa* L.) expostas ao excesso de ferro (Fe) e a diferentes concentrações de fósforo (P) quanto às características morfométricas de raízes e eficiência do uso do P. Três cultivares de arroz (Br/Irga 409, Irga 424, Irga 425) foram expostas ao excesso de +Fe (200mg L⁻¹) combinado com duas concentrações de P (2,5 e 25mg L⁻¹) em solução nutritiva, durante 22 dias. Foram determinadas as características morfométricas de raízes (comprimento radicular, área superficial, diâmetro e volume radicular), concentração de P no tecido de parte aérea, eficiência de absorção (PU_pE) e utilização (PU_tE) do P, produção de massa seca de raiz (MSR), altura, área foliar e massa seca de parte aérea (MSPA). A cultivar Irga 425 apresentou maior capacidade de utilização do P em condições de excesso de Fe, através do aumento nas variáveis morfométricas de raízes, refletindo positivamente na produção de MSR. Independente das concentrações de P, o excesso de Fe alterou a organização do centro quiescente, reduziu o número de células do meristema apical, refletindo em alterações no padrão de divisão celular. Todas as plantas apresentaram reduções na PU_tE com aumento na concentração de P na solução nutritiva. A cultivar Irga 425 quando cultivada na concentração de 25mg L⁻¹ de P sob excesso de Fe apresentou maiores concentrações de P no tecido da parte da parte aérea e maior PU_pE quando comparada com as cultivares Br/Irga 409 e Irga 424.

Palavras-chave: Absorção mineral, Raiz, *Oryza sativa* L., Toxidez.

ABSTRACT

Excess iron (Fe) is an important factor that reduces rice productivity under flooded soil conditions. The aim of this study was to characterize the root morphometric characteristics and phosphorus (P) use efficiency of three rice cultivars (*Oryza sativa* L.) exposed to excess iron (Fe) and different concentrations of phosphorus. Three rice cultivars (Br/Irga 409, Irga 424, Irga 425) were exposed to excess Fe (200mg L⁻¹) combined with two P concentration (2,5 and 25mg L⁻¹) in nutrient solution, at 22 days of treatment. The cultivar Irga 425 presented higher capacity of use of the under conditions of Fe excess, which was related to the better performance of the root morphometric parameters and root dry matter. Independently of P concentrations in nutrient solution, the Fe excess altered the organization of the quiescent center and decreased the number of cells in the root apical meristem, which caused changes in the pattern of cell division. All plants showed decrease in efficiency of use of the P with increase in P concentration in the nutrient solution. Under Fe excess and high P (25mg L⁻¹) in

nutrient solution, the cultivar Irga 425 showed higher shoot P concentration and absorption capacity of the P, when compared to the cultivars Br/Irga 409 and Irga 424.

Key words: Mineral absorption, Root, *Oryza sativa L.*, Toxicity.

INTRODUÇÃO

A disponibilidade limitada do P é resultado das características químicas dos solos, uma vez que este pode formar complexos com Fe e outros metais. A consequência evolutiva desta baixa disponibilidade de P resultou ao longo do tempo em um conjunto extremamente diversificado de espécies de plantas, com adaptações radiculares (crescimento de raiz primária, desenvolvimento de raízes laterais, formação de pelos radiculares) visando adquirir P e usá-lo internamente de maneira eficiente (ABEL, 2011; CHIOU e LI, 2001; LAMBERS et al., 2006; PERET et al., 2011; VEJCHASARN et al., 2016).

O termo eficiência refere-se a habilidade das espécies vegetais em absorver e utilizar os nutrientes ou mesmo relacionar a produtividade das culturas em função da unidade de nutriente aplicado na forma de adubo (FAGERIA e BALIGAR, 2005). Em geral, três estratégias podem melhorar a eficiência do uso P pelas plantas: (i) melhorar a aquisição de P, através de modificações radiculares; (ii) melhorar a extração de P através da dessorção, solubilização ou mineralização de P a partir de fontes moderadamente disponíveis no solo e (iii) melhorar a eficiência interna de utilização de P através do uso de plantas que produzam mais por unidade de P absorvido (RICHARDSON et al., 2011).

O Fe é um micronutriente importante para o crescimento e desenvolvimento das plantas. No entanto, em excesso conduz à toxicidade (BECKER e ASCH, 2005, FAGERIA et al. 2008) através da diminuição do alongamento e divisão celular, inibindo a iniciação e formação de raízes laterais (LI et al. 2012; 2015 a,b). Neste contexto, a manutenção de um adequado sistema radicular dos vegetais torna-se importante para uma ampla variedade de processos fisiológicos (YORK et al., 2013).

Estudos demonstram que interações antagonistas entre P e Fe alteram o controle do crescimento radicular via meristema primário (LI et al., 2015). Consequentemente, a manipulação das interações desses elementos poderia ser uma nova maneira de melhorar a nutrição fosfatada das culturas (WARD et al., 2008), quando as plantas são submetidas à toxidez por Fe. Entretanto, as espécies vegetais ou até mesmo cultivares dentro de uma mesma espécie, apresentam comportamentos distintos à toxidez de Fe (SILVEIRA et al., 2007; STEN et al., 2014). O presente estudo teve como objetivo caracterizar as respostas de

três cultivares de arroz (*Oryza sativa* L.) expostas ao excesso de Fe e a diferentes concentrações de P quanto às características morfológicas de raízes e eficiência do uso do P.

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL VEGETAL E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO

O experimento foi realizado em casa de vegetação localizada no campus da Universidade Federal de Santa Maria, RS. No estudo utilizou-se três cultivares de arroz, selecionadas a partir da tolerância a toxidez por Fe: IRGA 425 e IRGA 424 (Fe-tolerante), BR IRGA 409 (Fe-sensível) (SOSBAI 2014). As sementes inicialmente foram umedecidas em água destilada permanecendo a 25°C, no escuro durante 24 horas em placas de petri. Após este período as sementes pré-germinadas foram transferidas para caixas revestidas com papel germiteste parcialmente fechadas, sendo irrigadas com água destilada por 7 dias, em câmaras de crescimento climatizada.

Após 7 dias em água destilada, 5 plântulas foram transferidas para vasos contendo 5 L de solução nutritiva desenvolvida por Yoshida et al. (1976) com pequenas modificações. A solução nutritiva utilizada para aclimatar as plântulas durante 5 dias teve a seguinte composição: 40mg L⁻¹ NH₄NO₃, 2,5mg L⁻¹NaH₂PO₄.2H₂O, 40mg L⁻¹K₂SO₄, 40mg L⁻¹CaCl₂, 40mg L⁻¹ MgSO₄. 7H₂O, 0,5mg L⁻¹MnCl₂.4H₂O, 0,05mg L⁻¹ (NH₄)₆.MO₇O₂₄.4H₄O, 0,2mg L⁻¹ ¹H₃BO₃, 0,01mg L⁻¹ZnSO₄.7H₂O, 0,01mg L⁻¹ CuSO₄. 5H₂O, 2mg L⁻¹ EDTA-Fe₂SO₄.7H₂O.

Após o período de aclimação as plantas foram expostas ao excesso de +Fe (200mg L⁻¹) combinado com diferentes concentrações de P (2,5 e 25mg L⁻¹) em um sistema hidropônico não-aerado. As concentrações e a disponibilidade das formas iônicas do Fe e P na solução nutritiva foram estimadas usando o software Visual Minteq, os resultados da especiação encontram-se na Tabela 1.

Os tratamentos foram dispostos em esquema fatorial 3x2, sendo três cultivares (Br/Irga 409, Irga 424 e Irga 425) e duas concentrações de P (2,5 e 25mg L⁻¹), com três repetições e 5 plantas por repetição. As soluções foram renovadas a cada 4 dias e o pH ajustado em 5,6± 0.1 pela adição de NaOH ou HCl 0,1mol L⁻¹. A determinação das variáveis (morfológicas de raízes, biométricas de crescimento e nutricionais) foi realizada aos 22 dias após a aplicação dos tratamentos. As plantas submetidas aos diferentes tratamentos foram separadas em raízes e parte aérea.

VARIÁVEIS ANALISADAS

Análises morfométricas e anatômicas de raízes

As raízes foram suspensas em 0,5cm de água em uma bandeja acrílica transparente de $30 \times 40\text{cm}^2$ e depois escaneadas. As imagens foram analisadas através do uso do software WinRhizo Pro 2013, acoplado a um scanner EPSON Expression 11000 equipado com luz adicional (TPU) com definição de 600dpi. Foram determinados os seguintes parâmetros: comprimento das raízes, área superficial, diâmetro e volume radicular.

Para as análises histológicas, foram realizadas 4 lâminas por tratamento, cada lâmina com 4 cortes. O material foi fixado numa solução contendo glutaraldeído a 1% e formaldeído a 4% (MCDOWELL e TRUMP, 1976) em tampão de fosfato de sódio 0,1M, pH 7,2 (GABRIEL, 1982), seguido de lavagem no mesmo tampão, lavagem em água destilada e finalmente desidratação numa série de álcool etílico (O'BRIEN e MCCULLY, 1981). O material foi pré-infiltrado numa solução de metacrilato de 2-hidroxietilo (HEMA) e etanol a 99,5% (1:1) durante 12 h, seguido de infiltração em HEMA durante aproximadamente 4 h e incorporação num suporte de Teflon até a polimerização estar completa (GERRITS e SMID, 1983). As amostras de raízes foram seccionadas até uma espessura de $3\mu\text{m}$ utilizando um micrótomo rotativo Leica RM2245. Utilizou-se azul de toluidina em tampão de benzoato de sódio a 0,05%, pH 4,4 para colorir as lâminas histológicas (SIDMAN et al. 1961).

Componentes biométricos de crescimento

Foram determinadas a altura de plantas, com auxílio de uma régua graduada e a área foliar foi determinada através do uso do software WinRhizo Pro 2013, acoplado a um scanner EPSON Expression 11000 equipado com luz adicional (TPU), com definição 200dpi. Para determinação da massa seca de parte aérea (MSPA), as amostras foram colocadas em sacos de papel e transferidas para estufa em estufa a 65°C até peso constante, quando foram retiradas e pesadas separadamente em balança de precisão.

Concentração de P e Eficiência de uso do P

Após a pesagem, as amostras foram digeridas numa mistura de ácido de nítrico-perclórico e nos extratos minerais foram determinados as concentrações de P nos tecidos de parte aérea (CARMO et al., 2000).

O acúmulo de P nos tecidos foi obtido pelo resultado do produto entre a concentração de P e massa seca de cada órgão da planta (parte aérea ou raiz). Obtidos esses dados, calculou-se a eficiência de uso de P, que foi separada em eficiência de absorção de P (PU_pE): acúmulo de P na planta/massa seca de raiz, conforme Swiader et al. (1994), e a eficiência de utilização do P (PU_tE): (massa seca total da planta)²/acúmulo de P na planta inteira, conforme Siddiqi e Glass (1981).

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade de erro, com auxílio do programa estatístico *ASSISTAT*.

RESULTADOS

As variáveis comprimento radicular (Figura 1A), área superficial (Figura 1B), diâmetro (Figura 1C) e volume radicular (Figura 1D) apresentaram interação entre cultivares x concentrações de P. Quando submetidas ao excesso de Fe associado a baixa concentração de P (2,5mg L⁻¹), não houve diferença significativa entre as cultivares para o comprimento radicular. Porém, com o aumento na concentração de P (25mg L⁻¹) o comprimento radicular diferiu entre as cultivares, seguindo a seguinte ordem decrescente: Irga 425 > Irga 424 > Br/Irga 409 (Figura 1A). Nesta condição, a Irga 425 apresentou maior comprimento radicular, em relação as plantas submetidas a baixa concentração de P (2,5mg L⁻¹). Por outro lado, a cultivar Br/Irga 409 reduziu 58,90 % o comprimento radicular com aumento na concentração de P (25mg L⁻¹) na solução nutritiva.

Na concentração de 2,5mg L⁻¹ de P as cultivares não diferiram entre si quanto a área superficial (Figura 1B), o diâmetro (Figura 1C) e o volume radicular (Figura 1D). No entanto, com aumento na concentração de P (25mg L⁻¹), a cultivar Irga 425 apresentou a maior área superficial (Figura 1B), diâmetro (Figura 1C) e volume radicular (Figura 1D) em relação as outras duas cultivares.

Com aumento na concentração de P (25mg L⁻¹), a cultivar Irga 425 apresentou valores superiores de área superficial (Figura 1B), diâmetro (Figura 1C) e volume radicular (Figura

1D), quando comparada as plantas submetidas a baixa concentração de P ($2,5\text{mg L}^{-1}$). A cultivar Br/Irga 409 reduziu significativamente a área superficial radicular com o aumento na concentração de P na solução nutritiva (Figura 1B).

Independente das concentrações de P estudadas, as cultivares Fe tolerantes (Irga 424 e Irga 425) após a exposição ao excesso de Fe apresentaram o mesmo padrão de respostas estruturais, como alteração no padrão de divisão celular, perda do centro quiescente, acompanhadas de acentuadas reduções das áreas da columela. Além disso, as células do periciclo sofreram hipertrofia e hiperplasia como início do processo de formação de raízes laterais (Figura 2A, 2C). As mesmas alterações nas respostas estruturais citadas anteriormente foram observadas na cultivar sensível (Br/Irga 409), no entanto, esta cultivar apresentou columela e coifa bem definida quando comparado as cultivares tolerantes (Figura 2D).

A concentração de P na parte aérea (Figura 3A) e a eficiência de absorção de P (PU_pE) (Figura 3B) apresentaram interação entre cultivares x concentrações de P. As cultivares Irga 425 e Irga 424 apresentaram maior concentração de P na parte aérea, quando expostas ao excesso a 200mg L^{-1} de Fe associado a $2,5\text{mg L}^{-1}$ de P (Figura 3A). Com aumento na concentração de P na solução nutritiva, a cultivar Irga 425 apresentou maior concentração de P no tecido de parte aérea. Nesta condição, todas as cultivares apresentaram aumento na concentração de P no tecido de parte aérea, quando comparadas as plantas submetidas ao tratamento com $2,5\text{mg L}^{-1}$ de P (Figura 3A).

Para a PU_pE não houve diferença entre as cultivares quando foram expostas ao excesso de Fe associado a baixa concentração de P. No entanto, o aumento na concentração de P na solução nutritiva, aumentou a PU_pE da cultivar Irga 425, quando comparada as demais. Nesta condição, todas as cultivares aumentaram a PU_pE em relação as plantas cultivadas na concentração de $2,5\text{mg L}^{-1}$ de P (Figura 3C)

Já em relação a PU_tE houve resposta apenas ao fator concentrações de P utilizadas na solução nutritiva, com redução de 64% na PU_tE com o aumento da concentração de P na solução nutritiva (Figura 3D).

Independente dos tratamentos com Fe e P, a cultivar Br/Irga 409 apresentou maior altura em relação as outras duas cultivares. As menores médias de área foliar foram obtidas quando as plantas submetidas a maior concentração de P (25mg L^{-1}) na solução nutritiva. No entanto, independente das concentrações de P, as cultivares tolerantes (Irga 424 e Irga 425) apresentaram maior área foliar do que a cultivar sensível (Br/Irga 409). Já em relação a produção de MSR, a cultivar Irga 425 apresentou maior alocação de biomassa entre as cultivares avaliadas (Tabela 2).

DISCUSSÃO

A manutenção de um adequado sistema radicular pode ser a chave para a planta se adaptar a diferentes situações de estresse nutricional (CAI et al., 2011). Para a maioria das características morfométricas das raízes analisadas, observou-se variação e plasticidade das cultivares estudadas em relação às condições nutricionais estabelecidas.

No excesso de Fe (200mg L^{-1}), associado ao aumento na concentração de P (25mg L^{-1}) a cultivar Fe-tolerante (Irga 425) apresentou maior valor de comprimento (Figura 1A), área superficial (Figura 1B), diâmetro (Figura 1C) e volume radicular (Figura 1D) do que a cultivar Fe-sensível Br/Irga 409, refletindo em maiores concentrações de P no tecido de parte aérea (Figura 3A). Isto provavelmente, ocorreu pelo fato que o estabelecimento de um maior volume radicular, melhora a capacidade das raízes para absorver água e nutrientes minerais (ABICHEQUER e BOHNEN, 2008).

No presente trabalho, os resultados demonstram que a cultivar Irga 425 apresentou aumento de 56,92% no diâmetro radicular quando submetida ao excesso de Fe, associado a alta concentração de P (25mg L^{-1}) (Figura 1C). Wu et al. (2014) verificaram que a cultivar Fe-sensível (IR29) apresentou menor diâmetro de raiz do que a cultivar Fe-tolerante (Pokkali) em condições de excesso Fe. De acordo com estes autores, a cultivar Fe-tolerante apresentou raízes laterais de diâmetro maior, porém mais densas, em relação a cultivar Fe-sensível.

Verificou-se aumento na área superficial radicular da cultivar Br/Irga 409 quando submetida a baixa concentração de P (Figura 1B). Isso indica alteração no transporte de fotoassimilados para o sistema radicular, aumentando a superfície de exposição à solução nutritiva, conseqüentemente ocasionando uma maior absorção de nutrientes em condições de baixa concentração de P.

O maior volume radicular apresentado principalmente pela cultivar Irga 425 (Figura 1D), quando submetida ao excesso de 200mg L^{-1} de Fe e 25mg L^{-1} de P, indica que, de algum modo, o P estimulou a divisão celular. A capacidade das plantas de responder adequadamente ao suprimento de P é de fundamental importância para adaptação ao ambiente adverso. Lopez-Bucio et al. (2003) estudando plantas de *Arabidopsis thaliana* cultivadas em baixa concentração de P, verificaram aumentos na expressão de genes para transportadores de P nas membranas, associada a altas concentrações de auxina em seus meristemas. Em contrapartida, de acordo com os mesmos autores, diferentes mecanismos estão envolvidos na indução de alterações morfológicas de raízes relacionadas ao estresse de P e Fe. Pesquisas correlacionam a absorção de P com características morfológicas de raízes, sugerindo que o P seria percebido

localmente e agiria como um sinal para o controle do sistema radicular e formação de raízes laterais (NIU et al., 2012; PÉRET et al., 2011).

Em uma análise geral, observou-se que, independentemente da classificação das cultivares quanto sensibilidade ao excesso de Fe, todas as plantas sofreram alterações significativas nos tecidos das raízes quando submetidas ao excesso de Fe, principalmente por afetar a diferenciação celular, incluindo a perda de identidade do centro quiescente e dos meristemas vascular, dérmico e fundamental, levando a interrupção de acréscimo de novas células, refletindo em reduções no crescimento de maneira geral (Figura 2C, 2D). O centro quiescente do meristema apical das raízes de arroz é formado por quatro a oito células mitoticamente inativas que funcionam como organizador de células da raiz (NI et al., 2013). Adicionalmente, foram observadas alterações anatômicas como colapso celular, desorganização do cilindro vascular, alteração no padrão de diferenciação, no formato e volume celular (Figura 2C e 2D). Resultados semelhantes foram observados em espécies vegetais de restinga (SIQUEIRA-SILVA et al., 2012).

A exigência de P para o crescimento ótimo está na faixa de 0,3-0,5% de matéria seca vegetal durante a fase vegetativa de crescimento (MARSCHNER, 1995). No presente trabalho, as concentrações de P nos tecidos de parte aérea, independente das concentrações de P testados na solução nutritiva, estavam no intervalo de concentração adequado para o crescimento ótimo. No entanto, quando as cultivares foram submetidas ao excesso de Fe associada a baixa concentração de P ($2,5\text{mg L}^{-1}$), ocorreu redução na concentração de P nos tecidos de parte aérea (Figura 3A).

A eficiência de aquisição de P depende da capacidade das plantas em absorver e enraizar, enquanto a eficiência de utilização depende da translocação do P e da sua conversão em biomassa (MACHADO e FULANI, 2004). Os resultados mostram que as cultivares de arroz apresentaram diferentes respostas de PUpE (Figura 3B). O aumento na concentração de P (25mg L^{-1}), ocasionou aumento na concentração de P no tecido de parte aérea de todas as cultivares (Figura 3A), resultando em maior PUpE (Figura 3B). As plantas que têm uma maior eficiência de aquisição de P por unidade de C gasto para a construção e manutenção das raízes, teriam um melhor desempenho sob condições de baixa concentração de P (NIELSEN et al., 2001), uma vez que expandindo a área de absorção aumentaria o volume de solo explorado pelas raízes (SANES et al., 2013; WANG et al., 2010). Neste contexto, a cultivar Irga 425 apresentou maior PUpE (Figura 3B) e maiores valores dos parâmetros radiculares estudados (Figura 1A, 1B, 1C e 1D).

Adicionalmente, todas as plantas reduziram a P_UtE quando submetidas ao excesso de Fe, associado a alta concentração de P (Figura 3C). De acordo com Silveira et al. (2007) em condições de toxicidade por Fe, existe uma limitação para a utilização de P a partir da raiz (apoplasto/simplasto).

Independente das concentrações de P na solução nutritiva, nenhuma cultivar apresentou diferenças na produção de MSPA. A cultivar Irga 425, apresentou maior MSR em relação as demais. Da mesma forma, as cultivares Fe-tolerantes (Irga 424 e Irga 425) apresentaram maiores valores de área foliar, conseqüentemente apresentam maior área fotossinteticamente ativa, favorecendo o crescimento e desenvolvimentos das plantas em condições de excesso de Fe (Tabela 2). Os resultados permitem inferir que as cultivares variaram amplamente o comportamento quando submetidas ao excesso de Fe associado a concentrações contrastantes de P, resultando em distintos mecanismos de tolerância ao excesso de Fe.

CONCLUSÕES

A cultivar Irga 425 (tolerante) apresentou maior capacidade de utilização do P em condições de excesso de Fe, por meio do aumento das variáveis morfológicas de raízes analisadas [comprimento, área superficial, diâmetro e volume radicular] e maior eficiência de absorção de P;

Independente da disponibilidade de P, o excesso de Fe extinguiu a atividade meristemática das raízes, seguido de diferenciação do tecido vascular.

REFERÊNCIAS

ABEL, S. Phosphate sensing in root development. **Curr. Opin. Plant Biol.** v. 14, p. 303–309, 2011. DOI: 10.1016/j.pbi.2011.04.007.

ABICHEQUER, A. D.; BOHNEN, H. Comprimento e arquitetura de raízes de genótipos de arroz irrigado por inundação em solução nutritiva e sua relação com absorção de nutrientes e produção de matéria seca. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha.** v. 14, p. 7-12, 2008.

BECKER, M.; ASCH, F. Iron toxicity in rice-Conditions and management concepts. **J Plant Nutr Soil Sci.** v. 168, p. 558–573, 2005. DOI:10.1002/jpln.200520504.

- CAI, X. et al. Development of casparian strip in rice cultivars. **Plant Signaling & Behavior**. v. 6, n. 1, p. 59–65, 2011.
- CARMO, C. A. F. S. et al. Métodos de análise de tecidos vegetais utilizados na Embrapa Solos. Rio de Janeiro, Embrapa Solos, 2000. 41p. (Embrapa Solos. Circular Técnica, 6).
- CLARK, H. L.; HARRIS, W. H. Observations on the root anatomy of rice (*Oryza sativa* L.). **American Journal of Botany**. v. 68, n. 2, p. 154-161, 1981.
- FAGERIA, N. K.; WRIGHT, R. J.; BALIGA, V. C. Rice cultivar evaluation for phosphorus use efficiency. **Plant and Soil**. v. 111, p. 105-109, 1988.
- FAGERIA, N. K.; BALIGAR, V. C. Enhancing nitrogen use efficiency in crop plants. **Advances in Agronomy**. v. 88, p. 97–185, 2005.
- FAGERIA, N. K.; SANTOS, A. B.; FILHO, M. P. B. Iron Toxicity in Lowland Rice. **Journal of Plant Nutrition**. v. 31, p. 37–41, 2008. DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/01904160802244902>.
- GABRIEL, B. L. **Biological electron microscopy**. New York, Van Nostrand Reinhold Company, 1982.
- GERRITS, P. O.; SMID, L. A new less toxic polymerization system for the embedding of soft tissues in glycol methacrylate and subsequent preparing of serial sections. **J. Microsc.** v. 132, p. 81-85, 1983.
- LAMBERS, H. et al. Root structure and functioning for efficient acquisition of phosphorus: matching morphological and physiological traits. **Ann Bot.** v. 98, n. 4, p. 693-71, 2006. DOI:10.1093/aob/mcl114.
- LI, G. et al. Auxin resistant1 and PIN-FORMED2 protect lateral root formation in Arabidopsis under iron stress. **Plant Physiol.** 169:2608–26232015 (a). DOI: 10.1104/pp.15.00904.
- LI, G, XU, W.; KRONZUCKER, H. J.; SHI, W. Ethylene is critical to the maintenance of primary root growth and Fe homeostasis under Fe stress in Arabidopsis. **J. Exp. Bot.** v. 66, p. 2041–2054, 2015 (b). DOI: <https://doi.org/10.1093/jxb/erv005>.
- LI, X. et al. Responses of seedling growth and antioxidant activity to excess iron and copper in *Triticum aestivum* L. **Ecotox. Environ. Saf.** v.86, p. 47–53, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.09.010>.

LÓPEZ-BUCIO, J.; CRUZ-RAMÍREZ, A.; HERRERA-ESTRELLA, L. The role of nutrient availability in regulating root architecture. **Current Opinion in Plant Biology**. v. 6, p. 280-287, 2003. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(03\)00035-9](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(03)00035-9)

MACHADO, C. T. T.; FURLANI, Â. M. C. Kinetics of phosphorus uptake and root morphology of local and improved varieties of maize. **Sci Agric**. v. 61, n. 1, p. 69-76, 2004. DOI: <https://dx.doi.org/10.1590/S0103-90162004000100012>

MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. 2nd edition. San Diego: Academic Press Limited; 1995.

NI, J. et al. Definition and stabilisation of the quiescent centre in rice roots. **Plant Biol**. v. 16 n 5, p. 1014-9, 2013. DOI:10.1111/plb.12138.

NIELSEN, K. L.; ESHEL, A.; LYNCH, J. P. The effect of phosphorus availability on the carbon economy of contrasting common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genotypes. **J Exp Bot**. v. 52, p. 329-33, 2001.

NIU, Y. F. et al. Responses of root architecture development to low phosphorus availability: a review. **Ann Bot**. v. 112, p. 391-408, 2012. DOI: 10.1093/aob/mcs285.

O'BRIEN, T. P.; MCCULLY, M. E. **The study of plant structure principles and selected methods**. Melbourne, Termarcarphi Pty L, 1981.

PÉRET, B. et al. Root developmental adaptation to phosphate starvation: better safe than sorry. **Trends Plant Sci**. v. 16, p. 442–450, 2011. DOI: 10.1016/j.tplants.2011.05.006.

RICHARDSON, A. E. et al. Plant and microbial strategies to improve the phosphorus efficiency of agriculture. **Plant Soil**. v. 349, p. 121, 2011.

SANES, F. S. M.; CASTILHOS, R. M. V.; SCIVITTARO, W. B.; VAHL, L. C.; MORAIS, J. R. Morfologia de raízes e cinética de absorção de potássio em genótipos de arroz irrigado. *Rev. Bras. Ciência do Solo*. v. 37, n. 3. p. 688-697, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-06832013000300015>.

SIQUEIRA-SILVA, A. I. N. et al. Iron plaque formation and morphoanatomy of roots from species of restinga subjected to excess iron. **Ecotoxicology and Environmental**. v.78, p. 265–275, 2012.

SILVEIRA, V. C. et al. Influence of iron on mineral status of two rice (*Oryza sativa* L.) cultivars. **Brazilian J Plant Physiol**. v. 19, p. 127–139, 2007. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1677-04202007000200005>.

SIDDIQI, M. Y., GLASS, A. D. M. Utilization index: A modified approach to the estimation and comparison of nutrient utilization efficiency in plants. **J. Plant Nutr.** v. 4, p. 289-302, 1981. DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/01904168109362919>.

SIDMAN, R. L.; MOTTOLA, P. A.; FEDER, N. Improved polyester wax embedding for histology. **Stain Technology.** v. 36, p. 279-284, 1961.

SWIADER, J. M.; CHYAN, Y.; FREIJI, F. G. Genotypic differences in nitrate uptake and utilization efficiency in pumpkin hybrids. **J. Plant Nutr.** v. 17, p. 1687-1699, 1994. DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/01904169409364840>.

SOUSA, S. M. et al. Importância da morfologia radicular na eficiência da aquisição de fósforo. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2010; 33p. (Embrapa Milho e Sorgo. Documentos, 105).

STEIN, R. J.; LOPES, S. I. G.; FETT, J. P. Iron toxicity in field-cultivated rice: contrasting tolerance mechanisms in distinct cultivars. **Exp. Plant Physiol.** v. 26, p. 135, 2014.

SOSBAI. **Arroz Irrigado: Recomendações técnicas da pesquisa para o sul do Brasil.** Bento Gonçalves, RS, 2014. 192p.

VEJCHASARN, P.; LYNCH, J. P.; BROWN, K. M. Genetic variability in phosphorus responses of rice root phenotypes. **Rice.** v. 9, p. 29, 2016.

WANG, X. I.; YAN, X.; LIAO, H. Genetic improvement for phosphorus efficiency in soybean: a radical approach. **Ann Bot.** v. 106, p. 215-222, 2010. DOI: 10.1093/aob/mcq029.

WU, W.; CHENG, S. Root genetic research, an opportunity and challenge to rice improvement. **Field Crops Research.** v. 165, p. 111-124, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2014.04.013>.

WU, L. B. et al. Genetic and physiological analysis of tolerance to acute iron toxicity in rice. **Rice.** v. 7, n.1, p. 8, 2014.

YORK, L. M.; NORD, E. A.; LYNCH, J. P. Integration of root phenes for soil resource acquisition. **Front Plant Sci.** v. 4, p.355, 2013. DOI: 10.3389/fpls.2013.00355.

YOSHIDA, S. et al. **Laboratory manual for physiological studies of rice.** Philippines: The International Rice Research Institute, 1976. 82p.

Tabela 1 – Concentrações e disponibilidade de Fe e P na solução nutritiva estimadas pelo software VISUAL MINTEQ

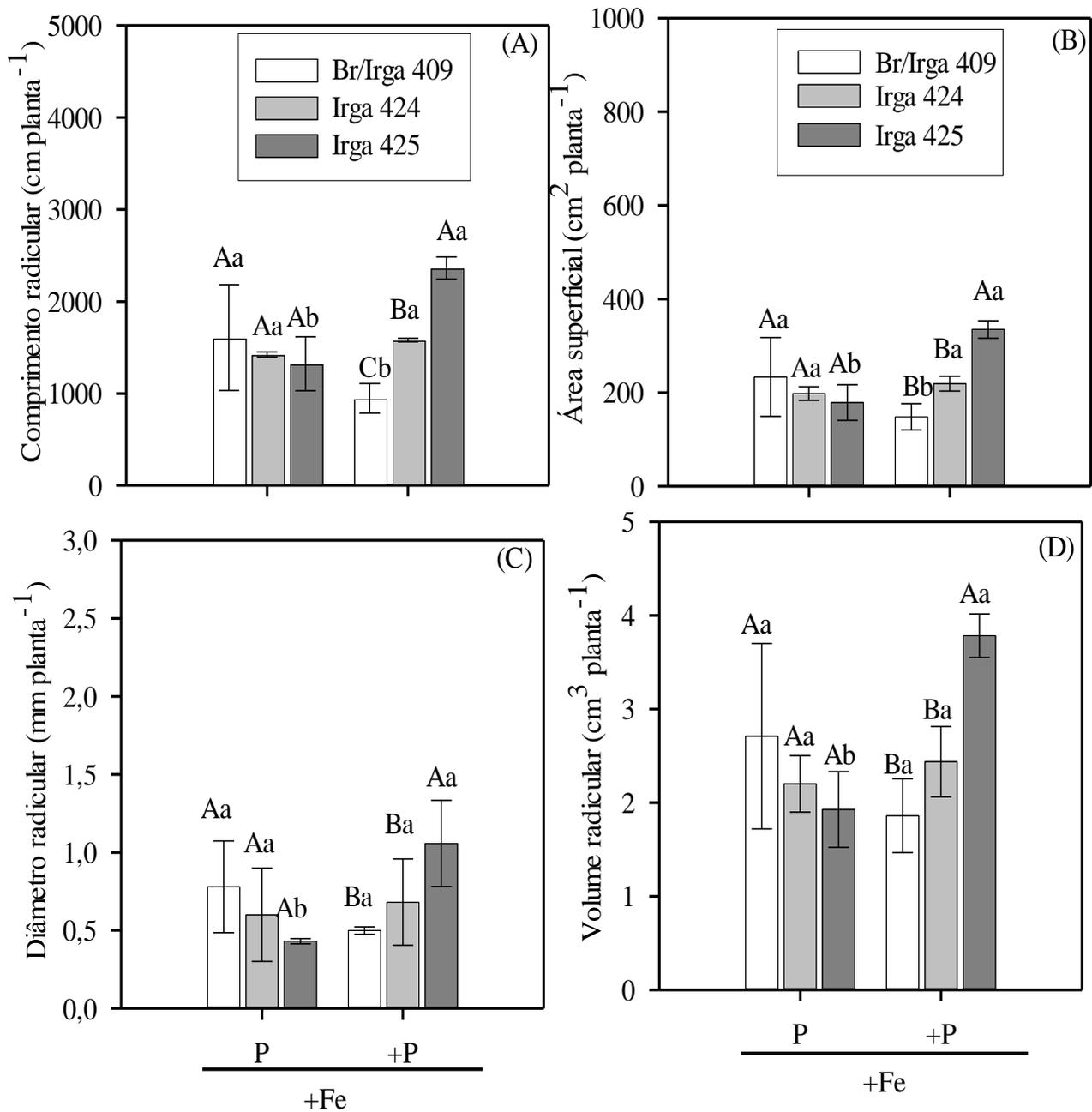
| Tratamentos | | Disponibilidade de Fe na solução nutritiva | Disponibilidade de P na solução nutritiva |
|-----------------------------------|-----|---|--|
| +Fe | P | | |
| ----- (mg L ⁻¹) ----- | | ----- % ----- | |
| 200 | 2,5 | 97 | 41 |
| 200 | 25 | 87 | 44 |

Tabela 2 – Componentes biométricos de crescimento [altura de plantas, área foliar, produção de massa seca de parte aérea (MSPA) e massa seca de raiz (MSR)] de cultivares de arroz (Br/Irga 409, Irga 424 e Irga 425) cultivadas sob excesso de +Fe (200mg L⁻¹) combinado com P (2,5mg L⁻¹) e +P (25mg L⁻¹) em solução nutritiva

| Componentes biométricos de crescimento | | | | |
|--|---------|--------------------|---------------------------|---------------------------|
| Tratamentos | Altura | Área foliar | MSPA | MSR |
| --- Fe (200 mg L ⁻¹) --- | (cm) | (cm ²) | (g planta ⁻¹) | (g planta ⁻¹) |
| P (2,5 mg L ⁻¹) | 22,38a | 21,96a | 0,103 a | 0,018 a |
| +P (25 mg L ⁻¹) | 20,65a | 16,70b | 0,106 a | 0,014 a |
| <i>Cultivares</i> | | | | |
| Br/Irga 409 | 25,13 a | 14,95b | 0,099 a | 0,012b |
| Irga 424 | 19,56 b | 19,56a | 0,105 a | 0,015 b |
| Irga 425 | 19,77 b | 23,48a | 0,109 a | 0,020 a |
| CV (%) | 14,76 | 22,91 | 17,60 | 24,74 |

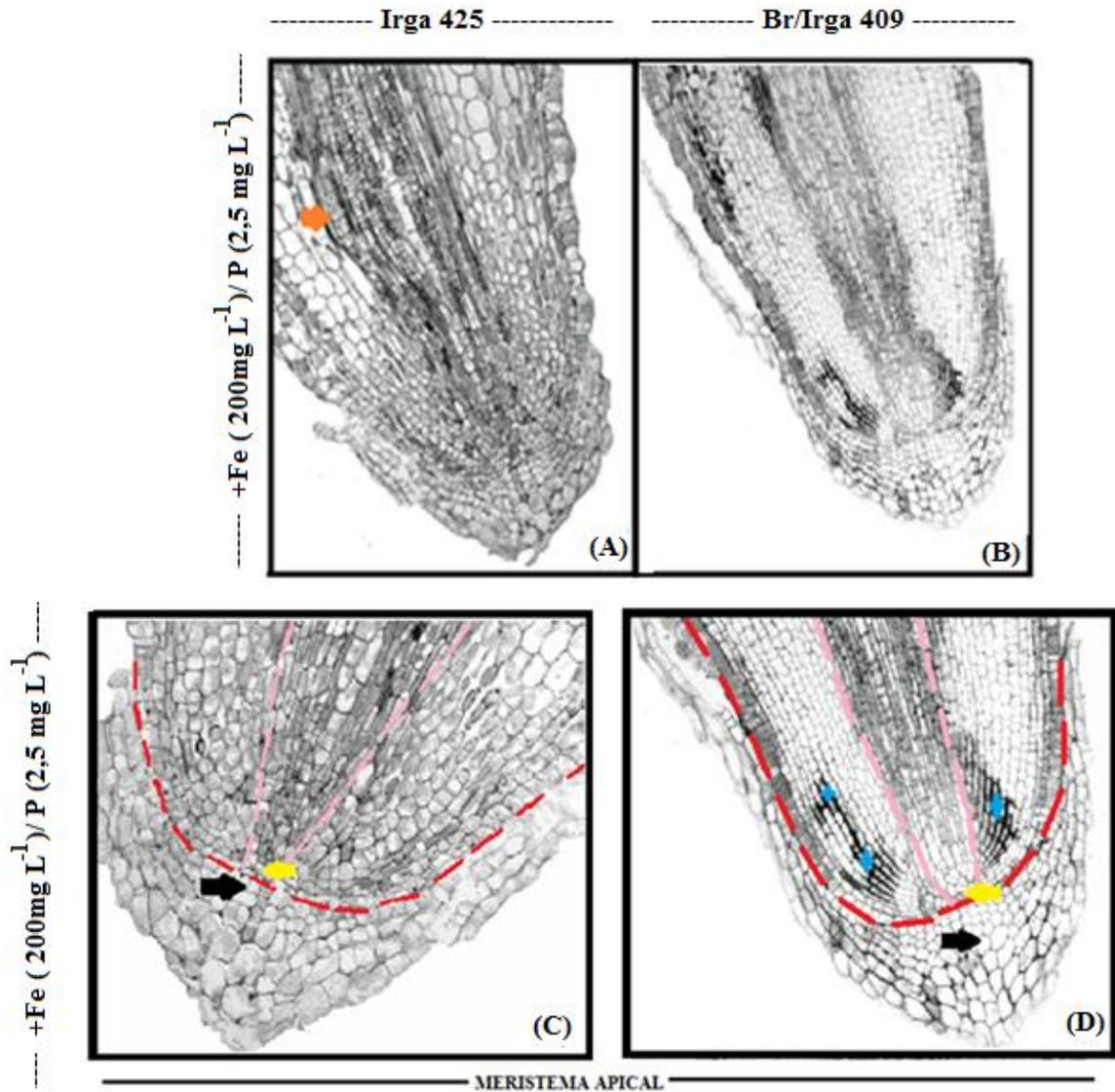
Médias seguidas por letras diferentes em cada coluna diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade do erro.

Figura 1 – Comprimento radicular (A), área superficial (B), diâmetro (C) e volume radicular (D) de três cultivares de arroz (Br/Irga 409, Irga 424 e Irga 425) cultivadas sob excesso de +Fe (200mg L⁻¹) combinado com P (2,5mg L⁻¹) e +P (25mg L⁻¹) em solução nutritiva



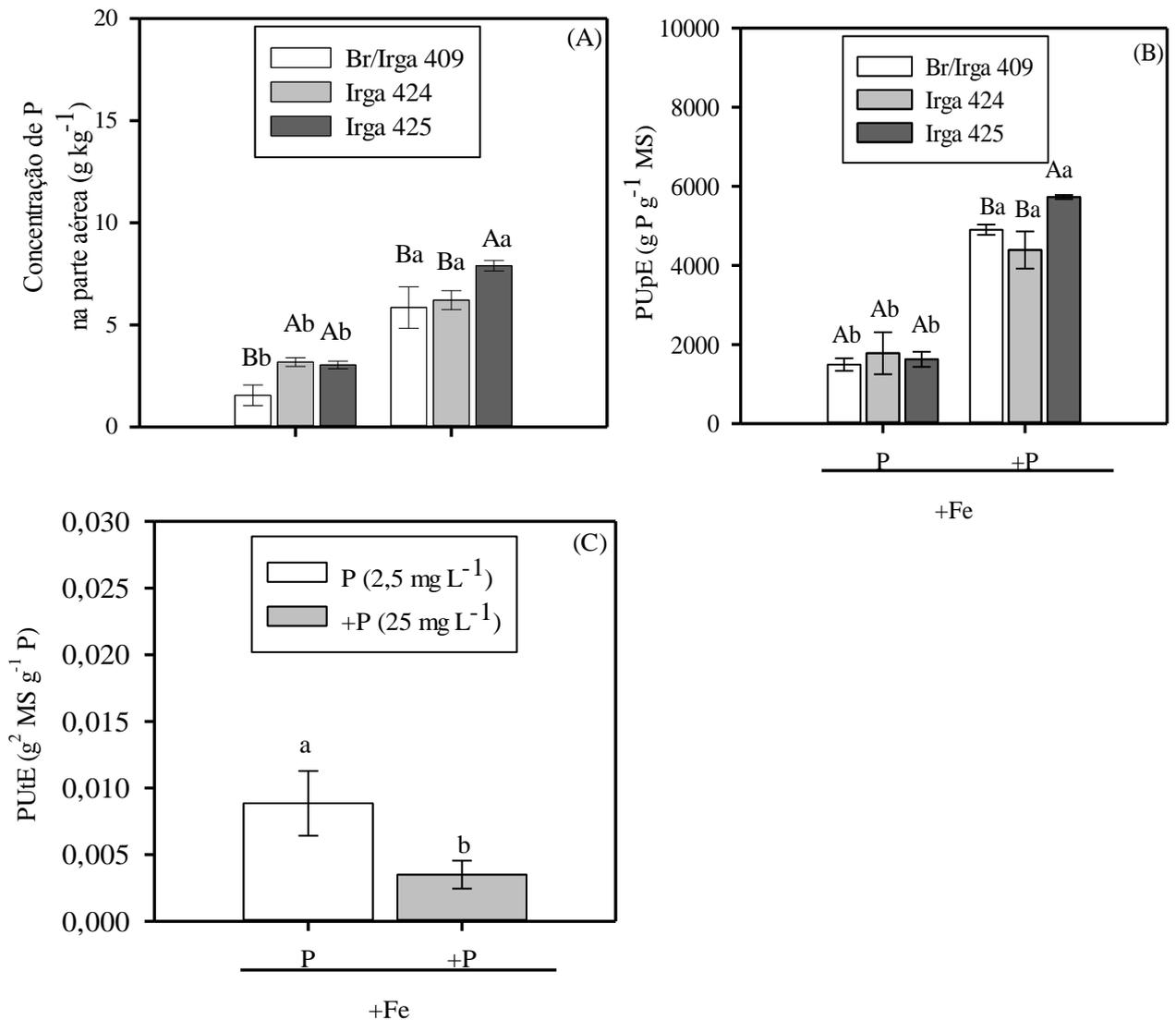
* Médias seguidas por letras diferentes diferem significativamente pelo teste Scott Knott a 5% de probabilidade do erro. Letra maiúscula compara as cultivares entre si em um mesmo tratamento. Letra minúscula compara a mesma cultivar em diferentes concentrações de P (2,5mg L⁻¹) e +P (25mg L⁻¹).

Figura 2 – Organização celular do sistema radicular de cultivares de arroz (Br/Irga 409 e Irga 425) quando submetidas a concentração de 200mg L^{-1} de Fe, associado com $2,5\text{mg L}^{-1}$ de P em solução nutritiva



(A, C) Secção longitudinal do meristema apical da cultivar Irga 425 quando submetida a concentração de Fe 200mg L^{-1} , associado com $2,5\text{mg L}^{-1}$ de P; Seta laranja representa modificação do periciclo; Linha tracejada vermelha representa o limite da columela e o meristema apical; A linha tracejada rosa representa o limite do estelo; Seta amarela indica as células do centro quiescente; Seta preta indica as células da columela. (B, D) Secção longitudinal do meristema apical da cultivar Br/Irga 409 quando submetida concentração de 200mg L^{-1} de Fe, associado com $2,5\text{mg L}^{-1}$ de P; Linha tracejada vermelha representa o limite da columela e o meristema acima; A linha tracejada rosa representa o limite do estelo; Seta amarela indica as células do centro quiescente; Seta preta indica as células da columela.

Figura 3 – Concentração de P total (A), Eficiência de absorção de P [PU_pE] (B) e Eficiência de utilização de P [PU_tE] (C) no tecido de parte aérea de três cultivares de arroz (Br/Irga 409, Irga 424 e Irga 425) cultivadas sob excesso de +Fe (200mg L⁻¹) combinado com P (2,5mg L⁻¹) e +P (25mg L⁻¹) em solução nutritiva



* Médias seguidas por letras diferentes diferem significativamente pelo teste Scott Knott a 5% de probabilidade do erro. Letra maiúscula compara as cultivares entre si em um mesmo tratamento. Letra minúscula compara a mesma cultivar em diferentes concentrações de P (2,5mg L⁻¹) e +P (25mg L⁻¹).

7. MANUSCRITO 4

IMPLICAÇÕES DA NUTRIÇÃO FOSFATADA NO METABOLISMO FOTOSSINTÉTICO E ANTIOXIDANTE DE CULTIVARES DE ARROZ SOB EXCESSO POR FERRO

IMPLICATIONS OF PHOSPHATE NUTRITION ON THE PHOTOSYNTHETIC AND ANTIOXIDANT METABOLISM OF RICE CULTIVARS CULTIVATED IN EXCESS OF IRON

RESUMO

O objetivo deste estudo foi investigar através de respostas fotossintéticas e antioxidantes, o efeito da nutrição de fósforo (P) como mitigador da toxidez de ferro (Fe) em cultivares de arroz. Três cultivares de arroz (Br/Irga 409, Irga 424, Irga 425) foram expostas as concentrações de Fe (2 e 200mg L⁻¹) combinadas com as concentrações de P (2,5, 15mg L⁻¹) em solução nutritiva, durante 60 dias. O excesso de Fe reduziu a massa seca de raízes e de parte aérea, resultando em elevados acúmulos de Fe nos tecido de parte aérea. Sob esta condição, a Br/Irga 409 e Irga 424 elevaram a atividade da guaiacol peroxidase. Entretanto, o sistema antioxidante não foi eficiente devido à maior peroxidação lipídica e taxa de assimilação de CO₂. A cultivar Irga 425 demonstrou baixa peroxidação lipídica, maior condutância estomática, eficiência de carboxilação da Rubisco, associada a elevada atividade superóxido dismutase, refletindo em maior taxa de assimilação de CO₂. Apesar do excesso de Fe reduzir o acúmulo de P nos tecidos de parte aérea, a adição de P atenuou os efeitos deletérios da toxidez, sendo que a cultivar Irga 425 apresentou maior tolerância em relação as demais cultivares.

Palavras-chaves: Fotossíntese, Sistema antioxidante, *Oryza sativa* L., Nutrição mineral.

ABSTRACT

Based on the antioxidant and photosynthetic parameters, the aim of this study was to investigate the effect of phosphate nutrition (P) as a mitigator of iron toxicity (Fe) in rice cultivars. Three rice cultivars (Br/Irga 409, Irga 424, Irga 425) were exposed to two concentrations of Fe (2 e 200mg L⁻¹) combined with two concentrations of P (2,5, 15mg L⁻¹) in nutrient solution, pH 5.6 for 60 days. Fe excess caused higher shoot Fe concentration, whereas it decreased the dry mass of roots and shoots. The cultivars Br/Irga 409 and Irga 424 increased the activity of guaiacol peroxidase. However, the antioxidant system was not efficient to avoid the increase in lipid peroxidation, and the decrease in CO₂ assimilation rate. The cultivar Irga 425 showed low lipid peroxidation, higher superoxide dismutase activity, higher stomatal conductance and carboxylation efficiency of Rubisco, which reflected in the increased CO₂ assimilation rate. Although the Fe excess reduced the accumulation of P in the shoots, the addition of P attenuated deleterious effects of the Fe toxicity, and the cultivar Irga 425 presented the higher tolerance, when compared to cultivars Br/Irga 409 and Irga 424.

Key words: Photosynthesis, Antioxidant system, *Oryza sativa* L., Mineral nutrition.

INTRODUÇÃO

Em todos os organismos vivos as interações dos metais com os compostos orgânicos são essenciais para manter a homeostase celular (BRIAT et al, 2010). O ferro (Fe) é um elemento fundamental para a realização de diversos processos bioquímicos e fisiológicos nos vegetais (VIGANI, 2013). Na fotossíntese, o Fe é um co-fator do complexo citocromo, dos fotossistemas (PSII e PSI) (STEWART e BRUDVIG, 1998) e participa da biossíntese de clorofila (YADAVALLI et al., 2012). Também é essencial para síntese de DNA (ribonucleótido redutase), lipídeos (lipoxigenase), hormônios (ácido 1-aminociclopropano-1 carboxílico (ACC) oxidase) e enzimas antioxidantes (superóxido dismutase) (CURIE et al., 2009).

Em solos em condições aeróbicas o Fe é encontrado na sua forma insolúvel Fe^{3+} . Já em ambientes anaeróbicos, este elemento é reduzido a Fe^{2+} tornando-se solúvel (PEZESHKI e DELAUNE, 2012). A toxidez por Fe^{2+} é o distúrbio nutricional de maior ocorrência em arroz (*Oryza sativa* L.), quando cultivado em sistemas alagados (SCHMIDT, 2013).

Devido à forte reatividade, o Fe quando em excesso, através da reação de Fenton, promove a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), especialmente o radical hidroxil (BRIAT et al. 2010, KOBAYASHI e NISHIZAWA, 2002). Estes radicais são altamente tóxicos e responsáveis pela peroxidação de lipídeos e proteínas (HELL e STHEPAN, 2003). Neste contexto, as células vegetais possuem mecanismos enzimáticos que eliminam ou reduzem os efeitos prejudiciais das EROs, tais como a superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX), catalase (CAT), guaiacol peroxidase (POD), bem como mecanismos não enzimáticos, através de compostos como a glutationa (GSH), ácido ascórbico (ASA), carotenoides e tocoferóis (YADAVALLI et al., 2012)

Mudanças na homeostase do Fe também podem influenciar a disponibilidade de outros elementos (JEONG e GUERINOT, 2009), a exemplo do fósforo (P) (HOWELER, 1973). O P é essencial para vários processos metabólicos vitais, uma vez que atua como componente das membranas vegetais e compostos intermediários da fotossíntese e respiração (HUANG et al., 2008). Na fotossíntese, reduções na disponibilidade de P promovem diminuição na regeneração da ribulose-1,5-bisfosfato no Ciclo Calvin, em resposta à redução na síntese de ATP (PIETERS et al., 2001). Estudos demonstram que as concentrações de P_i citoplasmáticos são essenciais para o adequado funcionamento de enzimas antioxidantes (AHN et al., 2005). Assim, um adequado suprimento de P pode aumentar a exclusão de Fe a partir de raízes e reduzir a absorção e translocação para a parte aérea da planta (SILVEIRA et al., 2007),

atenuando os efeitos da toxidez por Fe. Assim, o objetivo deste trabalho foi investigar através de respostas fotossintéticas e antioxidantes o efeito da nutrição de fósforo (P) como mitigador da toxidez de ferro (Fe) em cultivares de arroz.

MATERIAL E MÉTODOS

CONDIÇÃO EXPERIMENTAL

Três cultivares de arroz foram cultivadas em condições de casa de vegetação, em Santa Maria (29°42'56,44" S e 53°43'12,57"), Estado do Rio Grande do Sul, Brasil, de setembro de 2015 a dezembro de 2015.

Os materiais vegetais foram selecionados por apresentarem diferentes respostas a toxidez por Fe, sendo a IRGA 424 e IRGA 425 consideradas tolerantes e a BR/IRGA 409 considerada sensível. As cultivares tolerantes foram obtidas do banco de germoplasma do Instituto Rio Grandense de Arroz (IRGA); e a cultivar sensível, lançada em parceria da EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) com o IRGA (Instituto Rio Grandense de Arroz).

As sementes inicialmente foram umedecidas em água destilada permanecendo a 25°C, no escuro durante 24 horas em placas de petri. Após este período as sementes pré-germinadas foram transferidas para caixas revestidas com papel germiteste parcialmente fechadas, sendo irrigadas com água destilada por 7 dias, em câmaras de crescimento climatizada.

Subsequente à germinação, 5 plântulas foram transferidas as unidades experimentais, constituídas de vasos de 7kg preenchidos com areia. Os vasos receberam irrigações com a solução nutritiva até 80% da capacidade de campo. A solução nutritiva utilizada foi a de Yoshida (1976) com pequenas modificações, nas quais se testou diferentes concentrações de Fe, utilizando como fonte EDTA-FeSO₄.7H₂O, e diferentes concentrações de P, utilizando como fonte NaH₂PO₄.7H₂O. A solução nutritiva de Yoshida usada para aclimatar as plantas até o estágio V4 foi constituída de: 40mg L⁻¹ NH₄NO₃, 2,5mg L⁻¹NaH₂PO₄.2H₂O, 40mg L⁻¹K₂SO₄, 40mg L⁻¹CaCl₂, 40mg L⁻¹ MgSO₄. 7H₂O, 0,5mg L⁻¹MnCl₂.4H₂O, 0,05mg L⁻¹ (NH₄)₆.MO₇O₂₄.4H₄O, 0,2mg L⁻¹H₃BO₃, 0,01mg L⁻¹ZnSO₄.7H₂O, 0,01mg L⁻¹ CuSO₄. 5H₂O, 2mg L⁻¹ EDTA-Fe₂SO₄.7H₂O.

Quando as plantas emitiram a quarta folha (V4) forneceu-se solução até a formação de uma lâmina d'água de aproximadamente 3cm, bem como foram adicionados os tratamentos: excesso de Fe (200mg L⁻¹ Fe), controle de Fe (2mg L⁻¹), combinadas com diferentes concentrações de P (2,5 e 15mg L⁻¹). Obtendo-se as seguintes combinações nutricionais: 2,5

mg L⁻¹ de P e 2mg L⁻¹ de Fe [Fe/P]; 2,5mg L⁻¹ de P e 200mg L⁻¹ de Fe [+Fe/P]; 15mg L⁻¹ de P e 2mg L⁻¹ de Fe [Fe/+P], 15mg L⁻¹ de P e 200mg L⁻¹ de Fe [+P/+Fe]. Semanalmente adicionou-se solução para manter o nível da lâmina de água, a qual foi mantida até 60 dias após plantio. Os tratamentos foram dispostos em esquema fatorial 3x2x2, sendo três cultivares (Br/Irga 409, Irga 424 e Irga 425), duas concentrações de P (2,5 e 15mg L⁻¹) e duas concentrações de Fe, em 4 repetições, com 5 plantas cada repetição, totalizando 20 plantas por tratamento.

VARIÁVEIS ANALISADAS

Medições de trocas gasosas

Aos 60 dias após o plantio (DAP), foram realizadas medições de trocas gasosas no terço médio de folhas totalmente expandidas, com a utilização do medidor portátil Infra Red Gas Analyzer (IRGA), marca LI-COR, modelo LI-6400 XT, utilizando uma radiação fotossintética de 1500 μ mol m⁻² s⁻¹ e concentração de CO₂ de 400 μ mol mol⁻¹. Foram utilizadas duas plantas por repetição de cada tratamento e as leituras foram realizadas entre as 8 e 11 horas da manhã. Foram determinadas: a taxa de assimilação líquida de CO₂ (*A*), condutância estomática (*G_s*), concentração intercelular de CO₂ (*C_i*) e eficiência de carboxilação da Rubisco (*A/C_i*). As unidades foram expressas: *A* (mmol de CO₂ m⁻² s⁻¹), *G_s* (mol de H₂O m⁻² s⁻¹), *C_i* (μ mol CO₂ mol⁻¹) e *A/C_i*.

Concentração de Pigmentos

As concentrações de pigmentos (clorofilas e carotenoides) foram determinadas de acordo com o metodologia de Hiscox e Israelstam (1979) e estimadas de acordo com a fórmula de Lichtenthaler (1987). Utilizou-se 0,05g de material fresco para a determinação. As amostras frescas das folhas foram incubadas a 65°C em dimetilsulfóxido (DMSO) até os pigmentos serem completamente removidos. Para a determinação da clorofila a, b e carotenoides, a absorbância da solução foi medida em 663 e 645 e 470nm, respectivamente, utilizando um espectrofotômetro. A concentração dos pigmentos foi expressa em mg g⁻¹ MF (massa fresca).

Determinação de peróxido de hidrogênio

A concentração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) na parte aérea foi determinada seguindo a metodologia de Loreto e Velikova (2001), utilizando 0,1g de tecido que foram homogeneizadas com 2,0mL de 0,1% de ácido tricloroacético (TCA). O homogeneizado foi centrifugado a 10.000g durante 15 minutos a 4°C. A concentração de H_2O_2 foi obtida por absorvância de reação com tampão de fosfato de potássio 10mM (pH 7,0) e iodeto de potássio 1M, a 390nm e por comparação com uma curva padrão. A concentração de H_2O_2 foi expressa em $\mu\text{mol g}^{-1}$ MF.

Determinação da Peroxidação Lipídica (MDA)

A peroxidação lipídica foi estimada através dos danos celulares pelo do acúmulo de malondialdeído (MDA) como produto final da peroxidação lipídica, pela reação com ácido tiobarbitúrico (TBA) de acordo com El-Moshaty et al. (1993). Foi homogeneizado 0,5g de amostra em 4,0ml de tampão fosfato citrato TFK 0,2 M pH 6,5, após as amostras foram centrifugados em centrífuga refrigerada a 4°C durante 15 min, 20000g. Para a determinação de MDA, alíquotas 1,5 ml da fração do sobrenadante foram adicionados a um volume igual de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,5% (p/v) e ácido tricloroacético (TCA) 20% (p/v) e incubadas em banho-maria a 95°C por 40 minutos. A reação foi paralisada em banho de gelo por 15 minutos. Após centrifugação a 10 000 g durante 5 min, foi determinada a absorvância a 532nm, descontando-se a absorvância inespecífica a 600 nm. A concentração de MDA foi calculada e os resultados expressos em nM MDA mg^{-1} proteína.

Atividade Enzimática

Para determinação da atividade enzimática foram utilizadas amostras congeladas contendo 0.5 g de tecido previamente macerado em nitrogênio líquido. As amostras foram homogeneizadas utilizando 3 ml de tampão de fosfato de sódio 0,05 M (PH 7,8) incluindo EDTA 1 mM e Triton X a 1% (p/v) (ZHU et al., 2004). O sobrenadante foi utilizado para a avaliação da atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) e guaiacol peroxidase (POD). A atividade de SOD foi determinada de acordo com Giannopolitis e Ries (1977). E a POD foi determinada de acordo com Zeraik et al. (2008). A atividade das enzimas SOD e POD foram expressas em U mg^{-1} proteína e $\text{mmol tetraguaiacol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ de proteína, respectivamente.

Produção de biomassa e concentração de nutrientes

Após 60 dias as amostras foram separadas em parte aérea e raízes, em seguida foram colocados em sacos de papel e submetidos à secagem em estufa, com ventilação forçada a 75°C, durante 48 horas, para determinação da matéria seca de raízes (MSR) e de parte aérea (MSPA), por meio de pesagem em balança de precisão. A produção de MSPA e MSR foi expressa em g planta⁻¹.

O material vegetal foi seco em estufa por 72 horas a 65 -70°C, moído e submetidas à digestão nítrico-perclórica (CARMO et al., 2000) para quantificação das concentrações de Ferro (Fe) e de Fósforo (P) nos tecidos de parte aérea.

ANÁLISE DE ESTATÍSTICA

As diferenças nas concentrações de MDA, crescimento, concentração de clorofila, concentrações de nutrientes, trocas gasosas e atividade das enzimas antioxidantes foram analisados por análise de variância e teste de Scott Knott, com um nível de 5% de significância, usando o programa estatístico SISVAR.

RESULTADOS

As variáveis taxa de assimilação líquida de CO₂ (*A*) e a taxa de eficiência de carboxilação da Rubisco (*A/Ci*) apresentaram respostas à interação entre os fatores cultivares x concentrações de Fe x concentrações de P (Tabela 1). A variável condutância estomática (*Gs*) apresentou resposta significativa para o fator isolado de cultivares e concentrações de Fe. Já concentração intercelular de CO₂ (*Ci*) apresentou apenas resposta ao fator isolado concentrações de Fe (Tabela 2).

Na baixa concentração de Fe (2mg L⁻¹) associada a baixa concentração de P (2,5mg L⁻¹), as cultivares Irga 425 e Br/Irga 409 apresentaram maior *A* do que a cultivar Irga 424. Independente da concentração de Fe testada, a cultivar Irga 425 apresentou maior *A* do que a cultivar Br/Irga 409 com o aumento na concentração de P na solução nutritiva (Tabela 1).

Comparando a *A* no tratamento controle de Fe (2mg L⁻¹) em diferentes concentrações de P (2,5 e 15mg L⁻¹), verifica-se que as cultivares Irga 424 e Irga 425 apresentaram incrementos no valor da variável, quando aumentou a concentração de P na solução nutritiva (Tabela 2.). Em contrapartida, no excesso de Fe, associado a alta concentração de P, apenas a

cultivar Irga 425 apresentou acréscimos de 10,93% na *A*, em relação as plantas submetidas ao excesso de Fe e a baixa concentração de P (Tabela 1).

Independente das concentrações de P na solução nutritiva, a cultivar Br/Irga 409 foi a mais afetada pelo excesso de Fe, uma vez que apresentou redução na *A*, quando comparada as plantas submetidas aos tratamentos controle. Por outro lado, no excesso de Fe a cultivar Irga 425 foi a única que aumentou a *A* com aumento na concentração de P na solução nutritiva (Tabela 1).

Quando expostas a baixa concentração de P e Fe na solução nutritiva, as cultivares Irga 425 e Br/Irga 409 apresentaram maior de *A/Ci*, quando comparadas a cultivar Irga 424. No entanto, quando submetida ao excesso de Fe associado ao aumento na concentração de P, apenas a cultivar Irga 425 apresentou maior *A/Ci* em relação as outras duas cultivares (Tabela 1). No excesso de Fe, associado a baixa concentração de P, a cultivar Br/Irga 409, apresentou redução na *A/Ci*, quando comparada as plantas submetidas ao tratamento controle [Fe/P]. Por outro lado, nesta condição a cultivar Irga 424 apresentou comportamento oposto. A cultivar Irga 425, no excesso de Fe associado a alta concentração de P, apresentou aumento de 30,90% na *A/Ci* quando comparada as plantas submetidas ao tratamento controle [Fe/+P], fato que não foi observado nas demais cultivares (Tabela 1).

Alterações na *A* e *A/Ci* (Tabela 1) em condições de excesso de Fe foram acompanhadas por reduções de 40% na condutância estomática e de 11,75% na concentração intercelular de CO₂ (*Ci*). A *Gs* diferiu entre as cultivares seguindo a seguinte ordem decrescente: Irga 425 > Irga 424 > Br/Irga 409 (Tabela 2).

A variável concentração de clorofila a apresentou apenas resposta do fator cultivares. Já as concentrações de clorofila b e total apresentaram resposta do fator concentração de Fe. Para a concentração de carotenoides não houve diferença significativa (Tabela 2).

Os resultados demonstram que as cultivares Br/Irga 409 e Irga 425 apresentaram maiores concentrações de clorofila a do que a cultivar Irga 424. Independente da concentração de P testada na solução nutritiva, o excesso de Fe na solução nutritiva ocasionou decréscimos na concentração de clorofila b e total. A concentração de MDA apresentou somente resposta do fator cultivares, com menor concentração para a cultivar Irga 425 (Tabela 2).

Quanto à concentração de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), ocorreu interação entre os fatores cultivares x concentração de P (Figura 1). Quando submetidas à diferentes concentrações de P, a cultivar Irga 425 apresentou maior concentração de H₂O₂ em relação as

demais cultivares. Por outro lado, com aumento na concentração de P, apenas a cultivar Br/Irga 409 apresentou redução na concentração de H_2O_2 (Figura 1).

Para as enzimas do sistema antioxidante, superóxido dismutase (SOD) e guaiacol peroxidase (POD), ocorreu interação entre os fatores cultivares x concentrações de P x concentrações de Fe (Tabela 3).

Quando exposta a baixa concentração de Fe associada a alta concentração de P, a cultivar Irga 424 apresentou maior atividade da SOD, do que as demais cultivares. Por outro lado, quando submetida a $200mg L^{-1}$ de Fe, a cultivar Irga 425 apresentou maior atividade da SOD em relação às outras duas cultivares (Tabela 3).

Comparando a atividade da SOD no tratamento controle de Fe ($2mg L^{-1}$) em diferentes concentrações de P ($2,5$ e $15mg L^{-1}$), verifica-se que a cultivar Irga 424 apresentou incremento na atividade da SOD, com o aumento da concentração de P na solução nutritiva (Tabela 3). Em relação as plantas submetidas ao excesso de Fe, apenas a cultivar Irga 425 apresentou incremento na atividade da SOD com aumento na concentração de P (Tabela 2).

Quando exposta ao excesso de Fe associado a baixa concentração de P, a cultivar Br/Irga 409 apresentou maior valor na atividade da SOD, quando comparada as plantas submetidas ao tratamento controle [Fe/P]. Por outro lado, aumentando a concentração de P em condições de excesso de Fe, a cultivar Irga 425 foi a única que apresentou incrementos de 62,37% na atividade da SOD, em relação ao tratamento controle [Fe/+P] (Tabela 3).

Com aumento na concentração de P, associada ao tratamento controle de Fe, a cultivar Br/Irga 409 apresentou maior valor na atividade da POD do que as outras duas cultivares. Por outro lado, quando expostas a $200mg L^{-1}$ de Fe, associado a baixa concentração de P, a cultivar Br/Irga 409 seguida da Irga 425 apresentaram maior atividade da POD do que a Irga 424. No entanto, com aumento na concentração de P, em condições de excesso de Fe ($200mg L^{-1}$), apenas a Irga 425 apresentou redução na atividade da POD (Tabela 3).

Considerando a atividade da POD no tratamento controle de Fe ($2mg L^{-1}$) em diferentes concentrações de P ($2,5$ e $15mg L^{-1}$), observou-se que a cultivar Br/Irga 409 foi a única que aumentou a atividade da POD com aumento na concentração de P na solução nutritiva [Fe/+P]. (Tabela 3). Nesta condição, a cultivar Irga 424 reduziu a atividade da POD. Quando comparada as plantas submetidas ao excesso de Fe e baixa concentração de P, a cultivar Irga 424 apresentou incremento na atividade da POD com aumento na concentração de P [+Fe/+P] (Tabela 3).

Quando comparadas ao tratamento controle [P/Fe], as cultivares Br/Irga 409 e Irga 425 apresentaram aumentos significativos na atividade da POD, quando expostas a $200mg L^{-1}$

de Fe na presença de baixa concentração de P [+Fe/P]. Por outro lado, com o aumento na concentração de P associada ao excesso de Fe, todas as cultivares apresentam incrementos na atividade da POD (Tabela 3).

Quanto ao acúmulo de P no tecido de parte aérea, houve interação para os fatores concentração de Fe x cultivares e concentração de P x cultivares. Na baixa concentração de Fe (2mg L^{-1}) as cultivares Br/Irga 409 e Irga 425 apresentaram maiores acúmulos de P nos tecidos de parte aérea do que a Irga 424. Por outro lado, com o excesso de Fe as cultivares não diferiram entre si. Nessa condição, ocorreu redução no acúmulo de P para todas as cultivares (Tabela 4).

Notavelmente, com aumento na concentração de P na solução nutritiva, apenas a Irga 425 apresentou aumento no acúmulo de P no tecido de parte aérea. Nesta condição, essa cultivar apresentou aumento de 33,83% no acúmulo de P no tecido de parte aérea, quando comparado as plantas submetidas ao tratamento controle P ($2,5\text{ mg L}^{-1}$) (Tabela 4).

Já em relação a concentração de P no tecido de parte aérea houve resposta significativa aos fatores isolados concentrações de Fe e concentrações de P (Tabela 4). No excesso de Fe observou-se reduções na concentração de P nos tecidos de parte aérea. Por outro lado, com aumento na concentração de P na solução nutritiva constatou-se aumento na concentração de P nos tecidos de parte aérea (Tabela 4).

Para o acúmulo e concentração de Fe nos tecidos de parte aérea, houve respostas ao fator concentração de Fe utilizada na solução nutritiva (Tabela 5). No excesso de Fe ocorreu aumento de 22,41% na concentração de Fe nos tecidos de parte aérea, refletindo conseqüentemente em aumento da acumulação de Fe no tecido de 36,84% (Tabela 5).

Para a variável produção de massa seca de parte aérea por planta (MSPA), houve resposta a interação entre cultivares x concentração de P e cultivares x concentração de Fe (Figura 2A e 2B). Independente das concentrações de Fe testadas, as cultivares não diferiram entre si quanto a produção de MSPA. No entanto, quando expostas a 200mg L^{-1} de Fe, apenas a Br/Irga 409 reduziu a produção de MSPA (Figura 2A).

Na presença de baixo P, a cultivar Irga 424 apresentou maior produção de MSPA do que as outras duas cultivares. Entretanto, com aumento na concentração de P, a Irga 424 apresentou menor produção de MSPA, resultando em menores valores quando comparadas as plantas submetidas ao tratamento controle $2,5\text{mg L}^{-1}$ de P (Figura 2B).

A produção de massa de seca de raízes por planta (MSR) apresentou interação entre cultivares x concentrações de Fe x concentrações de P (Tabela 6). Houve diferenças significativas marcantes entre cultivares quanto à produção de MSR na condição controle de

Fe (2mg L^{-1}). Nessa condição, a cultivar Br/Irga 409 e Irga 425 apresentou maior produção de MSR, quando expostas a baixa concentração de P (Tabela 6). Com aumento na concentração de P, a cultivar Br/Irga 409 apresentou menor produção de MSR do que as outras cultivares.

No tratamento controle de Fe (2mg L^{-1}) combinado com diferentes concentrações de P ($2,5$ e 15mg L^{-1}), verificou-se que a cultivar Br/Irga 409 apresentou decréscimo de $42,70\%$ na produção da MSR, quando se aumentou a concentração de P na solução nutritiva [Fe/+P]. Já a cultivar Irga 424, nesta condição, apresentou incrementos de $57,76\%$ na produção de MSR. Quando expostas a 200mg L^{-1} de Fe, independente da concentração de P, todas as cultivares apresentaram reduções na MSR (Tabela 6).

DISCUSSÃO

Com o aumento na concentração de P apenas as cultivares Fe-tolerantes apresentaram aumentos na A (Tabela 1). De acordo com Pandey et al. (2015), a capacidade fotossintética é frequentemente aumentada sob alta concentração de CO_2 e com adequado fornecimento de P, possivelmente através da modulação de algumas envolvidas na fixação de carbono, como ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase (Rubisco).

No presente trabalho, em condições de toxidez por Fe, as alterações na A (Tabela 1), foram acompanhadas por reduções acentuadas no *Gs* e *Ci* de todas as cultivares estudadas (Tabela 2). É notável que em condições de toxidez por Fe a cultivar Br/Irga 409 apresentou maior decréscimo na *Gs* (Tabela 2) em relação às demais cultivares, refletindo em maiores limitações da A (Tabela 1) e, conseqüentemente, diminuições na produção de MSPA (Figura 2A). Pinto et al. (2016) relataram que a cultivar Br/Irga 409 apresentou decréscimos na A aos três dias após a exposição ao excesso de Fe.

O fechamento estomático pode causar indiretamente a diminuição no transporte de elétrons na fase fotoquímica, conseqüentemente favorecendo a fotoinibição e o stress oxidativo (PEREIRA et al., 2014). O ácido abscísico (ABA) desempenha função essencial na regulação estomática (SCHROEDER et al., 2001). Majerus et al. (2009) verificaram que o stress por excesso de Fe induziu o decréscimo no potencial hídrico da folha e ocasionou reduções na *Gs*. No entanto, quando utilizaram flurione, um inibidor da síntese de ácido abscísico (ABA), ocorreu um aumento visível no *Gs*. Zhang et al. (2001) sugerem que o H_2O_2 atua como um intermediário comum na sinalização do fechamento dos estômatos, uma vez que através da adição exógena de catalase (CAT) e difenileno iodônio (DPI), que são eliminadores de H_2O_2 , houve inibição do fechamento estomático. Desta forma, o ácido

abcíssico (ABA) pode estar envolvido na limitação estomática da fotossíntese como parte de uma resposta celular ao excesso por Fe e ao stress oxidativo (PEREIRA et al., 2014).

Em resposta ao aumento na concentração de Fe na solução nutritiva, verificou-se redução na concentração de clorofila total (Tabela 2), a qual pode refletir negativamente no adequado funcionamento da cadeia transportadora de elétrons. Resultados semelhantes foram relatados por Mehraban et al. (2008). A menor concentração de clorofila (Tabela 2) associada com a menor A (Tabela 1), pode resultar em um desequilíbrio na dissipação do excesso da energia dos fótons (XU et al. 2007). Adicionalmente, o Fe quando em grande disponibilidade na célula pode favorecer a formação EROs (DIVOL et al., 2013) por meio de reações de Fenton. De acordo com Pinto et al. (2016), a formação de EROs consiste na maior sensibilidade ao excesso de Fe por cultivares de arroz.

As EROs podem atuar como moléculas sinalizadoras e desencadear uma série de respostas celulares (MITTLER et al., 2004). No entanto, se a concentração de EROs exceder a capacidade de detoxificação dos tecidos vegetais, causam danos aos lipídios das membranas, as proteínas e aos pigmentos, podendo resultar em morte das células (SHARMA et al., 2012).

As EROs incluem principalmente o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o oxigênio singlete (1O_2), o ânion superóxido (O_2^-) e o radical hidroxil ($OH\cdot$) (BHATTACHARYA, 2015). No presente estudo, verificou-se que as cultivares Fe-tolerantes apresentaram aumentos na concentração de H_2O_2 em relação a cultivar Fe-sensível (Figura 1). Entretanto, a cultivar Br/Irga 409 reduziu a concentração de H_2O_2 quando submetida a alta concentração de P (Figura 1).

As células vegetais possuem mecanismos enzimáticos que eliminam ou reduzem os efeitos prejudiciais das EROs, a exemplo da superóxido dismutase (SOD) e da guaiacol peroxidase (POD) (YADAV e NIGAM, 2015). Baseada no metal co-fator utilizado pela SOD, esta é classificada em 3 grupos: SOD Ferro (Fe-SOD), SOD-Manganês (Mn-SOD) e SOD Cobre-Zinco (Cu-Zn SOD), correspondendo a isoformas localizadas em diferentes compartimentos. As isoformas de Fe-SOD estão localizados nos cloroplastos, as isoformas de Mn-SOD na mitocôndria e peroxissomos e as isoformas de Cu-Zn SOD no cloroplastos, citosol e espaço extracelular (ALSCHER et al., 2002). A SOD é considerada a primeira linha de defesa contra as EROs e catalisam a dismutação de dois radicais superóxido, gerando H_2O_2 e O_2 (CHANG-QUAN e RUI-CHANG, 2008), consequentemente participando da modulação do nível de H_2O_2 .

Independente da concentração de Fe e com aumento no fornecimento de P na solução nutritiva, a cultivar Irga 425 apresentou maior acúmulo de P no tecido de parte aérea do que

as outras cultivares (Tabela 4). Além disso, a cultivar apresentou maior atividade da SOD (Tabela 3), menor concentração de MDA, maior concentração de clorofila a (Tabela 2), e maior MSPA (Figura 2).

Quanto à POD, esta proteína catalisa a reação de conversão de H_2O_2 em H_2O (BARBOSA et al., 2014). Especialmente a cultivar Irga 424, em condições de toxidez por Fe e alto P [+P/+Fe], apresentou aumento de 74% na atividade da POD, em relação aquelas plantas tratadas em baixo P e alto Fe [P/+Fe] (Tabela 3). No geral, apesar das cultivares Br/Irga 409 e Irga 424 terem apresentado elevação da atividade da POD (Tabela 3) em condições de toxidez por Fe, as respostas não foram eficientes para diminuir os danos oxidativos, tanto que resultou em maior peroxidação lipídica (Tabela 2). He et al. (2008) destacaram que a atividade da SOD (superóxido dismutase) das células tratadas com Fe^{2+} foi mais elevada. Bode et al. (1995) destacam que existe uma ligação entre a tolerância ao Fe e a atividade SOD e POD. De acordo com Becker e Asch (2005), as atividades das enzimas SOD-POD são em grande parte responsáveis pela prevenção do estresse oxidativo em folhas de arroz.

As cultivares Fe-tolerantes na presença de alta concentração de P, em condições de excesso de Fe, apresentaram aumentos na atividade da SOD e POD (Tabela 3). Xiao et al. (2010) estudando a atividade de enzimas antioxidantes em *Pilea sinofasciata* quando submetidas a diferentes concentrações de P no solo, verificaram que sob alta concentração de P ocorreu maiores atividades das enzimas SOD e POD, assim como verificaram menores concentrações de malondialdeído. Yadav et al. (2010) analisando a influência de diferentes concentrações de P em arroz, observaram que em $80kg P_2O_5 ha^{-1}$ ocorreu aumento na produção de matéria seca da parte aérea e na atividade da SOD nas plantas.

Já em relação ao acúmulo de P nos tecidos da parte aérea (Tabela 4), todas as cultivares de arroz apresentaram reduções quando submetidas ao excesso de Fe, refletindo em reduções acentuadas na MSPA (Figura 2) e MSR (Tabela 6). Em geral, o excesso de Fe ($200mg L^{-1}$) na solução nutritiva ocasionou aumentos significativos na concentração de Fe nos tecidos de parte aérea (Tabela 5). No entanto, os resultados sugerem que a adição de P atenua os efeitos deletérios da toxidez de Fe por meio da ação sistema de enzimas antioxidante. Sendo que tais respostas variam de acordo com as cultivares estudadas.

CONCLUSÕES

Todas as cultivares apresentaram algum grau de sensibilidade ao excesso de Fe, que causou comprometimento da taxa de assimilação líquida de CO₂, condutância estomática, reduções nas concentrações de clorofila, os quais refletiram em reduções no crescimento;

A cultivar Br/Irga 409 apresentou maior sensibilidade à toxidez por Fe em relação à taxa taxa de assimilação líquida de CO₂;

As cultivares Irga 425 e Irga 424 apresentaram maior capacidade de utilização do P por meio de incrementos na atividade fotossintética e atividade enzimática (superóxido dismutase e guaiacol peroxidase).

O excesso de Fe reduziu significativamente o acúmulo de P de parte aérea de todas as cultivares.

REFERÊNCIAS

- AHN, T. et al. Effects of phosphorus fertilizer supplementation on antioxidant enzyme activities in tomato fruits. **Journal of agricultural and food chemistry**. v. 3, n. 5, p. 1539-45, 2005. DOI: 10.1021/jf040248y.
- ALSCHER, R.G.; ERTUR, N. E.; HEATH, L. S. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. **Journal of Experimental Botany**. v. 53, p. 1331–1341, 2002.
- BARBOSA et al. Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio em plantas. **Ciência Rural**. v. 44, p. 453-460, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782014000300011>.
- BHATTACHARYA, S. **Reactive oxygen species and cellular defense system**. In: RANI, V.; YADAV, U. C. S. (eds.), *Free radicals in human health and disease*, 2015, 17-29p.
- BECKER, M.; ASCH, F. Iron toxicity in rice- Conditions and management concepts. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**. v. 168, n. 4, p. 58–573, 2005. DOI:10.1002/jpln.200520504.
- BODE, K.; LIITHJE, S.; NEUE, H. The role of active oxygen in iron tolerance of rice (*Oryza sativa* L.). **Protoplasma**. v. 184, p. 249–255, 1995.
- BRIAT et al. New insights into ferritin synthesis and function highlight a link between iron homeostasis and oxidative stress in plants. **Annals of Botany**. v. 105, p. 811–822, 2010. DOI: 10.1093/aob/mcp128.

CARMO, C. A. F. S. et al. **Métodos de análise de tecidos vegetais utilizados na Embrapa Solos**. Rio de Janeiro, Embrapa Solos, 2000. 41p. (Embrapa Solos. Circular Técnica, 6).

CHANCE, B.; MEHLEY, A. C. Assay of catalase and peroxidases. **Methods in Enzymology**. v. 11, p.764-775, 1995.

CHANG-QUAN, W.; RUI-CHANG, L. Enhancement of superoxide dismutase activity in the leaves of white clover (*Trifolium repens* L.) in response to polyethylene glycol-induced water stress. **Acta Physiol Plant**. v. 30, p. 841–847, 2008.

CURI, C. et al. Metal movement within the plant: contribution of nicotianamine and yellow stripe 1-like transporters. **Annals of Botany**. v. 103, n. 1. p. 1-11, 2009. DOI: 10.1093/aob/mcn207.

DIVOL, F. et al. The Arabidopsis yellow stripe like 4 and 6 transporters control iron release from the chloroplast. **Plant Cell**. v. 25, p. 1040–55, 2013. DOI: 10.1105/tpc.112.107672.

EL-MOSHATY, F. I. B. et al. Lipid Peroxidation and superoxide production in cowpea (*Vigna unguiculata*) leaves infected with tobacco ringspot virus or southern bean mosaic virus. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. v. 43, p. 109–119, 1993. DOI: <https://doi.org/10.1006/pmpp.1993.1044>.

GUNES, A.; PILBEAM, D.J.; INAL, A. Effect of arsenic-phosphorus interaction on arsenic-induced oxidative stress in chickpea plants. **Plant and Soil**. v. 314, p. 211-220, 2009.

HE et al. Availability and toxicity of Fe(II) and Fe(III) in CaCo-2 cells. **J Zhejiang Univ Sci B**. v. 9, n. 9, p. 707–712, 2008. DOI: 10.1631/jzus.B0820023.

HELL, R.; STEPHAN, U. W. Iron uptake, trafficking and homeostasis in plants. **Planta**. v. 266, p. 541-551, 2003. DOI:10.1007/s00425-002-0920-4.

HISCOX, J. D.; ISRAELSTAM, G. F. A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. **Canadian Journal of Botany**. v. 57, p. 1132-1334, 1979. DOI: <https://doi.org/10.1139/b79-163>.

HOWELER, R. H. Iron-induced orangin disease of rice in relation to physico-chemical changes in flooded oxisol. **Soil Science Society of America Journal**. v. 37, p. 898-903, 1973.

HUANG, C. Y. et al. Metabolite profiling reveals distinct changes in carbon and nitrogen metabolism in phosphate-deficient barley plants (*Hordeum vulgare* L.). **Plant Cell Physio**. v. 49, p. 691–703, 2008. DOI: 10.1093/pcp/pcn044.

JEONG, J.; GUERINOT, M. L. Homing in on iron homeostasis in plants. **Trends in Plant Science**. v. 4, p. 280–285, 2009. DOI: 10.1016/j.tplants.2009.02.006.

LICHTENTHALER, H. K. Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. **Methods Enzymol.** v. 148, p. 350–382, 1987. DOI: [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(87\)48036-1](https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)48036-1).

LORETO, F.; VELIKOVA, V. Isoprene produced by leaves protects the photosynthetic apparatus against ozone damage, quenches ozone products, and reduces lipid peroxidation of cellular membranes. **Plant Physiol.** v. 127, p.1781–7, 2001.

KOBAYASHI, T.; NISHIZAWA, N. K. Iron uptake, translocation, and regulation in higher plants. **Annual Review of Plant Biology.** v. 63, p.131–152, 2002. DOI: 10.1146/annurev-arplant-042811-105522.

MAJERUS, V.; BERTIN, P.; LUTTS, S. Abscisic acid and oxidative stress implications in overall ferritin synthesis by African rice (*Oryza Glaberrima* steud.) seedlings exposed to short term iron toxicity. **Plant Soil.** v. 324, p. 253–265, 2009.

MEHRABAN, P.; ZADEH, A. A.; SADEGHPOUR, H. R. Iron toxicity in rice (*Oryza sativa* L.) under different potassium nutrition. **Asian Journal of Plant Sciences.** v. 7, p. 251-259, 2008. DOI: 10.3923/ajps.2008.251.259.

MILLER, G.; SHULAEV, V.; MITTLER, R. Reactive oxygen signaling and abiotic stress. **Physiol Plant.** v. 133, p. 481–9, 2008. DOI: 10.1111/j.1399-3054.2008.01090.x.

MISRA, H. P.; FRIDOVICH, I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **Journal of Biological Chemistry.** v. 247, p.3170– 5, 1972.

MITTLER, R. et al. Reactive oxygen gene network of plants. **Trends Plant Sci.** v. 9, p. 490–498, 2004.

MORRISSEY, J.; GUERINOT, M. L. Iron uptake and transport in plants: The good, the bad, and the ionome. **Chem Rev.** v. 109, n. 10, p. 4553–4567, 2009. DOI: 10.1021/cr900112r.

PANDEY, R. et al. Physiological and molecular alterations in plants exposed to high [CO₂] under phosphorus stress. **Biotechnology Advances.** v. 33, p. 303-16, 2015. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2015.03.011.

PEREIRA, E. G. et al. Iron excess affects rice photosynthesis through stomatal and non-stomatal limitations. **Plant Science.** v. 201-202, p. 81–92, 2014. DOI: 10.1016/j.plantsci.2012.12.003.

PEZESHKI, S. R.; DELAUNE, R. D. Soil oxidation-reduction in wetlands and its impact on plant functioning. **Biology (Basel).** v. 1, p. 196–221, 2012.

PIETERS, A. J.; PAUL, M. J.; LAWLOR, D. W. Low sink demand limits photosynthesis under P(i) deficiency. **Journal of Experimental Botany**. v. 52, p.1083–1091, 2001.

PINTO, S. S. et al. Oxidative damage and photosynthetic impairment in tropical rice cultivars upon exposure to excess iron. **Sci. Agric. (Piracicaba, Braz.)**. v. 73, n. 3, p. 217–226, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/0103-9016-2015-0288>.

SCHMIDT, F. et al. Impacto do manejo da água na toxidez por ferro no arroz irrigado por alagamento. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**. v. 37, p. 1226–1235, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-06832013000500012>.

SCHROEDER, J. I. et al. Guard cell signal transduction. **Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol**. v. 52, p. 627–658. DOI: 10.1146/annurev.arplant.52.1.627.

SHARMA, P. et al. 2012.Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. **Journal of Botany**. v. 2012, p. 26, 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2012/217037>.

SILVEIRA, V. C. et al. Influence of iron on mineral status of two rice (*Oryza sativa* L.) cultivars. **Brazilian Journal of Plant Physiology**. v. 19, p. 127-139, 2007. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1677-04202007000200005>.

STEWART, D. H.; BRUDVIG, G. W. Cytochrome b559 of photosystem II. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics**. v. 1367, p. 63-87, 1998. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(98\)00139-X](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(98)00139-X).

VIGANI, G. et al. Cellular iron homeostasis and metabolism in plant. **Front Plant Sci**. v. 4, p. 490, 2013. DOI: 10.3389/fpls.2013.00490.

XIAO, F. Z. et al. Ethylene is involved in root phosphorus remobilization in rice (*Oryza sativa* L.) by regulating cell-wall pectin and enhancing phosphate translocation to shoots. **Annals of Botany**. v. 118, p. 645-653, 2016. DOI: 10.1093/aob/mcw044.

XU, H. X.; WENG, X. Y.; YANG, Y. Effect of phosphorus deficiency on the photosynthetic characteristics of rice plants. **Russ J Plant Physiol**. v. 54, p. 741–748, 2007.

YADAV, S. K. S. et al. Phosphorus effect on growth, biochemical changes and yield of rice plant during submergence. **Asian Journal of Bio Science**. v. 5, n. 1, p. 129-133, 2010.

YADAVALLI, V. et al. Differential degradation of photosystem I subunits under iron deficiency in rice. **J Plant Physiol**. v. 169, p. 753–759, 2012. DOI: 10.1016/j.jplph.2012.02.008.

YOSHIDA, S. et al. **Laboratory manual for physiological studies of rice**. Philippines: The International Rice Research Institute, 1976. 82p.

ZERAIK, A. E. et al. 2008. Desenvolvimento de um spot test para o monitoramento da atividade da peroxidase em um procedimento de purificação. *Quim Nova*, v. 31, p. 731–734. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422008000400003>.

ZHANG, X. et al. Hydrogen peroxide is involved in abscisic acid-induced stomatal closure in *Vicia faba*. **Plant Physiol.** v. 126, p.1438–48, 2001.

ZHU, Z. et al. Silicon alleviates salt stress and increases antioxidant enzymes activity in leaves of salt-stressed cucumber (*Cucumis sativus* L.). **Plant Sci.** 167: 527- 533, 2004.

Tabela 1 –Taxa de assimilação de CO₂ (A) e taxa de eficiência de carboxilação da Rubisco (A/Ci) de três cultivares de arroz (Br/Irga 409, Irga 424 e Irga 425) cultivadas em diferentes concentrações de Fe (2, 200mg L⁻¹) e de P (2,5 e 15mg L⁻¹) na solução nutritiva

| | Fe (2mg L ⁻¹) | | +Fe (200mg L ⁻¹) | |
|---|----------------------------|----------------------------|------------------------------|----------------------------|
| | P (2,5mg L ⁻¹) | +P (15mg L ⁻¹) | P (2,5mg L ⁻¹) | +P (15mg L ⁻¹) |
| <i>A</i> (mmol de CO ₂ m ⁻² s ⁻¹) | | | | |
| Br/Irga 409 | 17,14 Aαα | 16,24 Baα | 12,55 Aαβ | 13,04 Baβ |
| Irga 424 | 12,34 Bbα | 17,50 Aαα | 14,11 Aαα | 13,89 Baβ |
| Irga 425 | 15,51 Abα | 18,74 Aαβ | 14,43 Abα | 21,04 Aαα |
| <i>A/Ci</i> | | | | |
| Br/Irga 409 | 0,050 Aαα | 0,050 Aαα | 0,046 Aαβ | 0,046 Baα |
| Irga 424 | 0,037 Baβ | 0,051 Aαα | 0,061 Aαα | 0,049 Baα |
| Irga 425 | 0,052 Aαα | 0,055 Aαβ | 0,059 Aαα | 0,072 Aαα |

Médias seguidas por letras diferentes diferem significativamente pelo teste Scott Knott a 5% de probabilidade do erro. Letra maiúscula compara cultivares entre si em um mesmo tratamento (P/Fe, +P/Fe, P/+Fe, +P/+Fe). Letra minúscula compara a mesma cultivar nos tratamentos de P na mesma concentração de Fe (P/Fe, +P/Fe; P/+Fe, +P/+Fe). Letra grega compara a mesma cultivares em diferentes concentrações de Fe na mesma concentração de P (P/Fe, P/+Fe; +P/Fe, +P/+Fe).

Tabela 2 – Condutância estomática (Gs), concentração intercelular de CO₂ (Ci), peroxidação lipídica (MDA), concentração de clorofila a (Chl a), clorofila b (Chl b), clorofila total (Chl total) e carotenoides (Carot.) em folhas de três cultivares de arroz (Br/Irga 409, Irga 424 e Irga 425) cultivadas em diferentes concentrações de Fe (2, 200mg L⁻¹) e de P (2,5 e 15mg L⁻¹) na solução nutritiva

| | Gs | Ci | MDA | Chl a | Chl b | Chl total | Carot |
|-------------------------------|--|---|---------------------------------------|--------|--------|----------------------------|--------|
| | mol de H ₂ O m ⁻² s ⁻¹ | μmol CO ₂ mol ⁻¹ | nM de MDA g ⁻¹ proteína | | | mg g ⁻¹ MF..... | |
| <i>Fe (mg L⁻¹)</i> | | | | | | | |
| 2 | 0,52 α | 322,33 α | 0,56 α | 1,18 α | 2,94 α | 4,12 α | 1,26 α |
| 200 | 0,32 β | 284,43 β | 0,54 α | 1,17 α | 0,74 β | 1,91 β | 0,43 α |
| <i>Cultivares</i> | | | | | | | |
| Br/Irga 409 | 0,35 B | 297,36 A | 0,57 A | 1,23 A | 0,78 A | 3,27 A | 0,45A |
| Irga 424 | 0,39 B | 304,36 A | 0,58 A | 1,06 B | 0,68 A | 2,89 A | 0,41A |
| Irga 425 | 0,51 A | 308,44 A | 0,50 B | 1,25 A | 0,73 A | 3,32 A | 0,42A |

Médias seguidas por letras diferentes diferem significativamente a 5% pelo teste Scott Knott. Letras maiúsculas compara cultivares entre si. Letra grega compara a mesma cultivar em diferentes concentrações de Fe (2, 200mg L⁻¹).

Tabela 3 – Atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD) e guaiacol peroxidase (POD) de três cultivares de arroz (Br/Irga 409, Irga 424 e Irga 425) cultivadas em diferentes concentrações de Fe (2, 200mg L⁻¹) e de P (2,5 e 15mg L⁻¹) na solução nutritiva

| | Fe (2mg L ⁻¹) | | +Fe (200mg L ⁻¹) | |
|---|----------------------------|----------------------------|------------------------------|----------------------------|
| | P (2,5mg L ⁻¹) | +P (15mg L ⁻¹) | P (2,5mg L ⁻¹) | +P (15mg L ⁻¹) |
| SOD (Umg ⁻¹ proteína) | | | | |
| Br/Irga | 9,44 Aaβ | 11,90 Baα | 18,41 Aaα | 15,18 Baα |
| Irga 424 | 14,90 Abα | 23,31 Aaα | 13,23 Aaα | 13,33 Baα |
| Irga 425 | 10,01 Aaα | 14,11 Baβ | 16,16 Abα | 42,95 Aaα |
| POD (mmol tetraguaiacol. min ⁻¹ .mg ⁻¹ de proteína) | | | | |
| Br/Irga | 1,93 Abβ | 3,90 Aaβ | 4,98 Aaα | 5,98 Aaα |
| Irga 424 | 2,21 Aaα | 0,77 Bbβ | 1,40 Cbα | 5,54 Aaα |
| Irga 425 | 1,80 Aaβ | 0,93 Baβ | 3,27 Baα | 3,59 Baα |

Médias seguidas por letras diferentes diferem significativamente pelo teste Scott Knott a 5% de probabilidade do erro. Letra maiúscula compara cultivares entre si em um mesmo tratamento (P/Fe, +P/Fe, P/+Fe, +P/+Fe). Letra minúscula compara a mesma cultivar nos tratamentos de P na mesma concentração de Fe (P/Fe, +P/Fe; P/+Fe, +P/+Fe). Letra grega compara a mesma cultivares em diferentes concentrações de Fe na mesma concentração de P (P/Fe, P/+Fe; +P/Fe, +P/+Fe).

Tabela 4 – Acumulação e concentração de P nos tecidos de parte aérea de três cultivares de arroz (Br/Irga 409, Irga 424 e Irga 425) cultivadas em diferentes concentrações de Fe (2, 200mg L⁻¹) e de P (2,5 e 15mg L⁻¹) na solução nutritiva

| Cultivares | Fe (2mg L ⁻¹) | +Fe (200mg L ⁻¹) | Fe (2mg L ⁻¹) | +Fe (200mg L ⁻¹) |
|-------------------|---|------------------------------|--|------------------------------|
| | Acumulação de P (g planta ⁻¹) | | Concentração de P (mg kg ⁻¹) | |
| Br/Irga 409 | 4,09 Aα | 2,01 Aβ | 3024,74 | 2281,66 |
| Irga 424 | 3,00 Bα | 2,33 Aβ | 3285,46 | 2427,54 |
| Irga 425 | 4,31 Aα | 2,23 Aβ | 4067,67 | 2472,01 |
| Med ^I | 3,80 | 2,19 | 3459,29 α | 2393,73 β |
| | P (2,5mg L ⁻¹) | +P (15mg L ⁻¹) | P (2,5mg L ⁻¹) | +P (15mg L ⁻¹) |
| Br/Irga 409 | 3,16 Aa | 2,94 Ba | 2663,35 | 2643,06 |
| Irga 424 | 2,81 Aa | 2,53 Ba | 3139,11 | 2618,35 |
| Irga 425 | 2,74 Ab | 3,79 Aa | 3536,78 | 2958,43 |
| Med ^{II} | 2,90 | 3,08 | 2739,95 b | 3113,08 a |

Médias seguidas por letras diferentes diferem significativamente pelo teste Scott Knott a 5% de probabilidade do erro. Letras maiúsculas compara cultivares entre si em um mesmo tratamento. Letra grega compara a mesma cultivar em diferentes concentrações de Fe (2, 200mg L⁻¹). Letra minúscula compara a mesma cultivar em diferentes concentrações de P (2,5 e 15mg L⁻¹). Med^I compara nas concentrações de Fe (2mg L⁻¹ e 200mg L⁻¹). Med^{II} compara nas concentrações de P (2,5mg L⁻¹ e 15mg L⁻¹).

Tabela 5 – Acumulação e concentração de Fe nos tecidos de parte aérea de três cultivares de arroz (Br/Irga 409, Irga 424 e Irga 425) cultivadas em diferentes concentrações de Fe (2, 200mg L⁻¹) e de P (2,5 e 15mg L⁻¹) na solução nutritiva

| Cultivares | Fe (2mg L ⁻¹) | +Fe (200mg L ⁻¹) | Fe (2mg L ⁻¹) | +Fe (200mg L ⁻¹) |
|-------------------|--|------------------------------|---|------------------------------|
| | Acumulação de Fe (g planta ⁻¹) | | Concentração de Fe (mg kg ⁻¹) | |
| Br/Irga 409 | 2,00 | 2,05 | 146,08 | 258,51 |
| Irga 424 | 1,48 | 2,44 | 150,50 | 266,64 |
| Irga 425 | 1,96 | 2,45 | 203,04 | 265,98 |
| Med ^I | 1,81 β | 2,31 α | 166,54 β | 263,73 α |
| | P (2,5mg L ⁻¹) | +P (15mg L ⁻¹) | P (2,5mg L ⁻¹) | +P (15mg L ⁻¹) |
| | | | | |
| Br/Irga 409 | 2,35 | 1,70 | 212,79 | 193,80 |
| Irga 424 | 2,14 | 1,78 | 199,94 | 217,20 |
| Irga 425 | 2,16 | 2,26 | 230,12 | 238,90 |
| Med ^{II} | 2,22 a | 1,91 a | 213,61 a | 216,63 a |

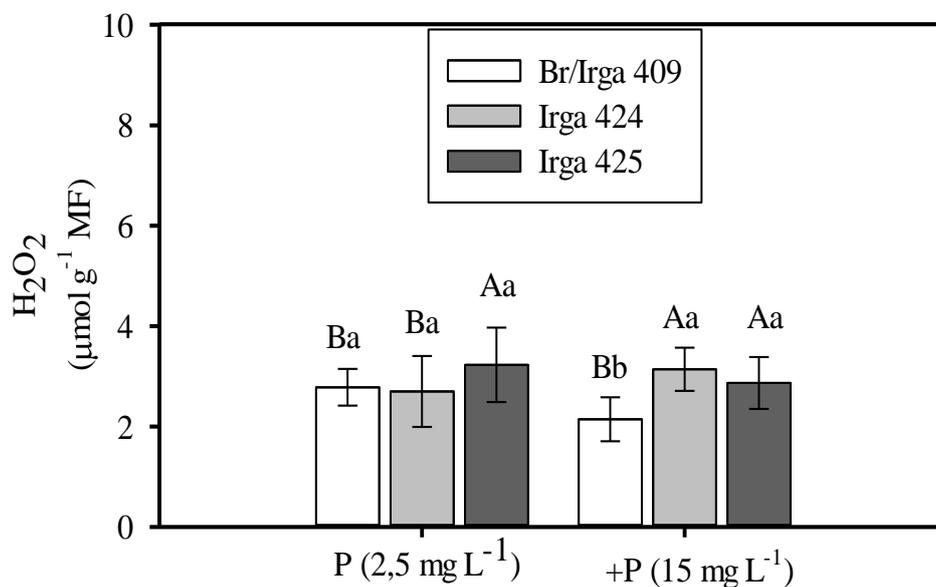
Médias seguidas por letras diferentes diferem significativamente pelo teste Scott Knott a 5% de probabilidade do erro. Letra grega compara a mesma cultivar em diferentes concentrações de Fe (2, 200mg L⁻¹). Letra minúscula compara a mesma cultivar em diferentes concentrações de P (2,5 e 15mg L⁻¹). Med^I compara nas concentrações de Fe (2mg L⁻¹ e 200mg L⁻¹). Med^{II} compara nas concentrações de P (2,5mg L⁻¹ e 15mg L⁻¹).

Tabela 6 – Massa seca de raiz (MSR) de três cultivares de arroz (Br/Irga 409, Irga 424 e Irga 425) cultivadas em diferentes concentrações de Fe (2, 200mg L⁻¹) e de P (2,5 e 15mg L⁻¹) na solução nutritiva

| | Fe (2mg L ⁻¹) | | +Fe (200mg L ⁻¹) | |
|-------------|-------------------------------|----------------------------|------------------------------|----------------------------|
| | P (2,5mg L ⁻¹) | +P (15mg L ⁻¹) | P (2,5mg L ⁻¹) | +P (15mg L ⁻¹) |
| | MSR (g planta ⁻¹) | | | |
| Br/Irga 409 | 2,18 Aaα | 1,25 Bbα | 0,25 Aaβ | 0,19 Aaβ |
| Irga 424 | 1,21 Bbα | 1,90 Aaα | 0,21 Aaβ | 0,21 Aaβ |
| Irga 425 | 2,15 Aaα | 1,80 Aaα | 0,21 Aaβ | 0,21 Aaβ |

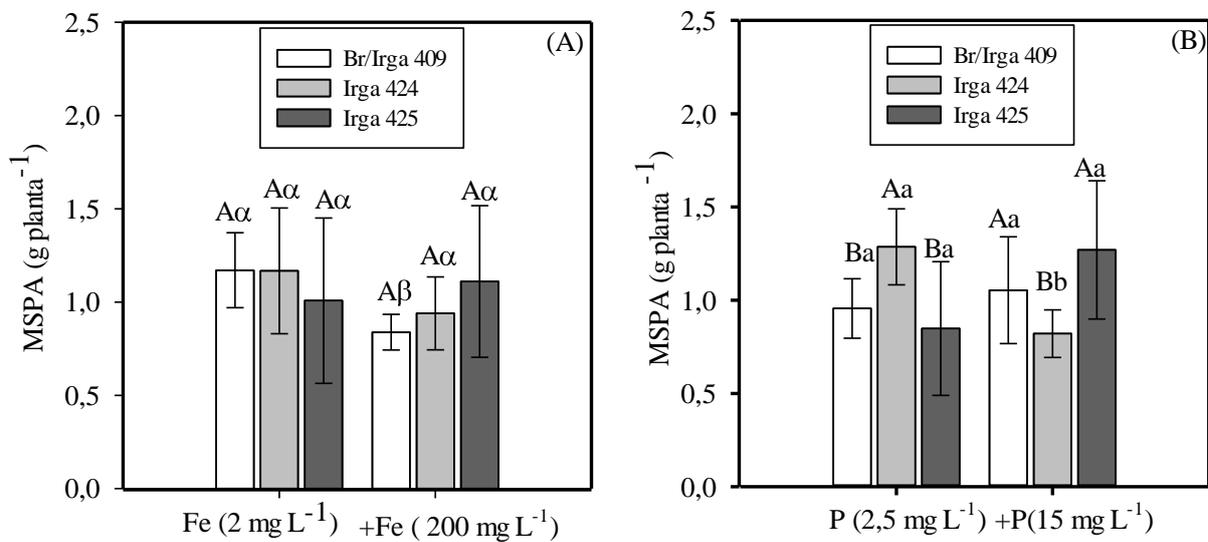
Médias seguidas por letras diferentes diferem significativamente pelo teste Scott Knott a 5% de probabilidade do erro. Letra maiúscula compara cultivares entre si em um mesmo tratamento (P/Fe, +P/Fe, P/+Fe, +P/+Fe). Letra minúscula compara a mesma cultivar nos tratamentos de P na mesma concentração de Fe (P/Fe, +P/Fe; P/+Fe, +P/+Fe). Letra grega compara a mesma cultivar em diferentes concentrações de Fe na mesma concentração de P (P/Fe, P/+Fe; +P/Fe, +P/+Fe).

Figura 1 – Mudanças na concentração de peróxido de hidrogênio em folhas de três cultivares de arroz cultivadas em diferentes concentrações de Fe (2, 200mg L⁻¹) e de P (2,5 e 15mg L⁻¹) em solução nutritiva



*Médias seguidas por letras diferentes diferem significativamente pelo teste Scott Knott a 5% de probabilidade do erro. Letra maiúscula compara cultivares entre si em um mesmo tratamento. Letra minúscula compara a mesma cultivar em diferentes concentrações de P (2,5 e 15mg L⁻¹).

Figura 2 – Massa seca de parte aérea (MSPA) de três cultivares de arroz em diferentes concentrações de Fe (2, 200mg L⁻¹) e de P (2,5 e 15mg L⁻¹) em solução nutritiva



*Médias seguidas por letras diferentes diferem significativamente pelo teste Scott Knott a 5% de probabilidade do erro. Letra maiúscula compara cultivares entre si em um mesmo tratamento. Letra grega compara a mesma cultivar em diferentes concentrações de Fe (2 e 200mg L⁻¹). Letra minúscula compara a mesma cultivar nos tratamentos de P (2,5 e 15mg L⁻¹)

8. DISCUSSÃO GERAL

O presente trabalho se propôs a caracterizar os aspectos bioquímicos, fisiológicos e morfométricos de cultivares de arroz (*Oryza sativa* L.) submetidas ao excesso de Fe e analisar as diferentes concentrações de P como possível fator mitigador da toxicidade.

O Fe é um micronutriente importante para as plantas. No entanto, devido à dinâmica do Fe no solo, este representa dois grandes problemas: de um lado, tem-se a deficiência como consequência de problemas de solubilidade em ambientes aeróbicos; e, de outro, a toxicidade, devido ao excesso de solubilidade em condições anaeróbicas (SANTOS, 2006).

A toxidez por Fe é uma desordem nutricional associada à excessiva absorção do mesmo pela planta (toxidez direta) ou à deficiência generalizada de outros nutrientes (toxidez indireta) (SOUSA, 2004; STEIN, 2009). O excesso de Fe pode causar desbalanços nutricionais nas plantas, induzindo à deficiência de alguns nutrientes, tais como fósforo, cálcio, potássio, magnésio e zinco. No entanto, os níveis críticos de toxicidade de Fe em plantas dependem da espécie vegetal (DOBERMANN e FAIRHURST, 2000).

Em geral, no presente trabalho, a adição de Fe (200mg L⁻¹) na solução nutritiva ocasionou aumentos significativos na concentração de Fe nos tecidos de parte aérea (Manuscrito 2 e 4). O excesso de Fe associado ao aumento na concentração de P na solução nutritiva reduziu a concentração de manganês na parte aérea e de raiz. Por outro lado, aumentou a eficiência de absorção de P (Manuscritos 2 e 3).

Os principais sintomas de toxidez por Fe em arroz são inicialmente evidenciados nas raízes, as quais tendem a paralisar seu crescimento em extensão e aumentar em diâmetro. De maneira geral, independente das concentrações de P, o excesso de Fe alterou a organização do centro quiescente, reduziu o número de células do meristema apical (Manuscrito 3), o que refletiu em reduções na produção de massa seca de raiz (Manuscrito 4).

A maior concentração de P em condições de excesso de Fe, ocasionou maior acúmulo de P nos tecidos de parte aérea. A cultivar Irga 425 (Fe- tolerante) apresentou maior eficiência de absorção de P do que a cultivar Br/Irga 409 (sensível) (Manuscritos 2 e 4), cujas respostas se refletiram nos parâmetros fotossintéticos (Manuscrito 4).

O Fe livre potencializa a geração de EROs via reações de Fenton e de Haber-Weiss, que podem causar danos irreversíveis aos lipídios e proteínas. Neste contexto, verificou-se alta concentração de H₂O₂, principalmente das cultivares Fe-tolerantes (Manuscrito 4), sendo que a cultivar Br/Irga 409 apresentou baixa peroxidação lipídica, com aumento na

concentração de P em condições de excesso de Fe, indicando que o uso de P tem efeito sobre a diminuição de danos à membrana (peroxidação lipídica).

Um outro aspecto importante é que o aumento na concentração de P, em condições de excesso de Fe, promoveu aumento na atividade da superóxido dismutase da cultivar Irga 425 e, conseqüentemente, ocasionando baixa peroxidação lipídica, maior atividade fotossintética e incrementos na produção de massa seca de parte aérea. Enquanto, as cultivares Br/Irga 409 e Irga 424, com aumento na concentração de P em condições de excesso de Fe, não apresentaram aumento na atividade da superóxido dismutase. As respostas obtidas por estas cultivares não foram eficientes para reduzir os danos oxidativos, tanto que resultaram em maior peroxidação lipídica (Manuscrito 4).

Ante ao exposto, embora as cultivares sejam classificadas quanto à tolerância e susceptibilidade à toxidez por Fe, no presente estudo, independente da classificação, todas as plantas foram afetadas pelo aumento na concentração de Fe na solução nutritiva. No entanto, as cultivares tolerantes foram eficientes em utilizar o P em condições de toxidez por Fe quando comparadas a cultivar sensível. Neste sentido, a escolha das cultivares validou o estudo, demonstrando que as mesmas apresentaram distintos mecanismos de uso de P em condições de toxidez de Fe. Nessa perspectiva, esses dados contribuem com informações visando à escolha de cultivares para a gestão de práticas agrícolas em ambientes com problemas de toxicidade por Fe.

9. CONCLUSÕES GERAIS

-O excesso de Fe reduziu o número de células do meristema apical das raízes, refletindo em reduções na produção de massa de raiz de todas as cultivares;

- A cultivar Fe-tolerante (Irga 425) apresentou maior concentração de P no tecido de parte aérea em todos os experimentos, acompanhado de maior eficiência de absorção de P, o que refletiu em incrementos na atividade fotossintética e atividade da superóxido dismutase;

- As cultivares Irga 424 e cultivar Irga 425 apresentaram maior concentração cobre em condições de toxicidade por Fe, favorecendo o adequado crescimento em condições de excesso de Fe.

- No início do período vegetativo (15 dias) nenhuma cultivar estudada apresentou reduções na concentração de clorofilas e carotenoides; porém no final do período vegetativo (60 dias) ocorreu comprometimento nos parâmetros fotossintéticos, os quais refletiram em drásticas reduções no crescimento;

- O aumento na concentração de P na solução nutritiva reduziu a concentração de Fe nos tecidos de parte aérea de raízes de todas as cultivares, bem como foi significativamente importante para mitigar a peroxidação lipídica, evidenciando sua importância como fator minimizador da toxidez de Fe em plantas de arroz.

10. REFERÊNCIAS

- ALSCHER, R.G.; ERTURK, N.; HEATH, L.S. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. **J Exp Bot.** v 53, p.1331–1341, 2002.
- ALVES, V. M. C et al. Cinética de absorção de fósforo e crescimento do sistema radicular de genótipos de milho contrastantes para eficiência a fósforo. **Rev. Bras. de Milho e Sorgo.** v.1, n.1, p.85-92, 2002.
- BALEMI, T.; NEGISHO, K. Management of soil phosphorus and plant adaptation mechanisms to phosphorus stress for sustainable crop production: a review. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition.** v. 12, n. 3, p. 547-561, 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-95162012005000015>.
- BALK, J, SCHAEGLER, T. A. Iron cofactor assembly in plants. **Annu. Rev. Plant Biol.** v. 65, p. 125–153, 2014. DOI: 10.1146/annurev-arplant-050213-035759.
- BECKER, M.; ASCH, F. Iron toxicity in rice - Conditions and management concepts. **Plant Nutr Soil Sci.** v 168, p. 558–573, 2005. DOI:10.1002/jpln.200520504.
- BODE, K.; LIITHJE, S.; NEUE H. The role of active oxygen in iron tolerance of rice (*Oryza sativa* L.). **Protoplasma.** v. 184, n 1, p 249–255, 1995.
- BRIAT, J. F. et al. New insights into ferritin synthesis and function highlight a link between iron homeostasis and oxidative stress in plants. **Annals of Botany,** v. 105, p. 811–822, 2010. DOI:0.1093/aob/mcp128.
- BROADLEY, M. et al. Function of nutrients. In: Mineral Nutrition of Higher Plants, 3 rd edn., ed. P Marschner, p. 19- 248, 2012.
- BUCHER, M. Functional biology of plant phosphate uptake at root and mycorrhiza interfaces. **New Phytol.** v. 173, n. 1, p 11-26, 2007. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2006.01935.x.
- CAMARGO, F. A. O.; SANTOS, G. A.; ZONTA E. Alterações eletroquímicas em solos inundados. **Ciência Rural.** v. 29, n.1, 1999. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84781999000100032>.
- CAVERZAN. A. et al. Plant responses to stresses: role of ascorbate peroxidase in the antioxidant protection. **Genetics and Molecular Biology.** v. 35, n. 4, p. 1011-1019, 2012.

CHANG-QUAN, W.; RUI-CHANG, L. Enhancement of superoxide dismutase activity in the leaves of white clover (*Trifolium repens* L.) in response to polyethylene glycol-induced water stress. **Acta Physiol Plant.** v. 30, p. 841–847, 2008.

CHEN, R. F. et al. Response of rice (*Oryza sativa* L.) with root surface iron plaque under aluminium stress. **Ann Bot.** v. 98, p. 389–395, 2006. DOI:10.1093/aob/mcl110.

COLMER, T. D. Long-distance transport of gases in plants: a perspective on internal aeration and radial oxygen loss from roots. **Plant Cell. Environ.** v. 26, p. 17-36, 2003. DOI:10.1046/j.1365-3040.2003.00846.x.

COSGROVE, D. J. Growth of the plant cell wall. **Nat Rev Mol Cell Biol.** v. 6, p. 850, 2005. DOI: 10.1038/nrm1746.

CURIE, C. et al. Metal movement within the plant: contribution of nicotianamine and yellow stripe 1-like transporters. **Annals Bot.** v. 103, p. 1–11, 2009. DOI: 10.1093/aob/mcn207.

CZARNECKI, O. et al. A dual role of strigolactones in phosphate acquisition and utilization in plants. **Int J Mol Sci.** v. 14, n. 4, p. 7681–7701, 2013.

DAN, D. et al. Effects of root anatomy and Fe plaque on arsenic uptake by rice seedlings grown in solution culture. **Environmental Pollution.** v. 158, p. 2589-2595, 2010.

DOBERMANN, A., FAIRHURST, T. H. **Rice: Nutrient disorders and nutrient management.** The Philippines: The International Rice Research Institute, Manila, 2000, p191.

ENGEL, K.; ASCH, F.; BECKER, M. Classification of rice genotypes based on their mechanisms of adaptation to iron toxicity. **J Plant Nutr Soil Sci.** v. 175, p. 871–881, 2012. DOI:10.1002/jpln.201100421.

EVANS, D. E. Aerenchyma formation. **New Phytologist.** v.161, p. 35-49, 2003. DOI: 10.1046/j.1469-8137.2003.00907.x.

FAGERIA, N. K.; BALIGAR, D V. C. Phosphorus use efficiency in wheat genotypes. **Journal of Plant Nutrition.** v. 22, p. 331–340, 1999. DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/01904169909365630>.

FAGERIA, N. K.; BALIGAR, V. C. Enhancing nitrogen use efficiency in crop plants. **Advances in Agronomy.** v. 88, p. 97–185, 2005. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(05\)88004-6](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(05)88004-6).

FAGERIA, N. K.; SANTOS, A. B.; FILHO, M. P. B. Iron toxicity in lowland rice. **Journal of plant nutrition.** v. 31, n. 9, 2008. DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/01904160802244902>.

GONÇALVES, G. K. **Disponibilidade de fósforo em solos reduzidos**. 2007. 188 p. (Tese de Doutorado)-. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

GONÇALVES, G. K.; MEURER, J. E. Espécies de fósforo na solução de solos cultivados com arroz irrigado por alagamento no Rio Grande do Sul. **Rev Bras Agrociência**. v. 17, p. 261–272, 2011.

GROSS, J. et al. Iron homeostasis related genes in rice. **Genet. Mol.Biol.** v. 26, n.4, p. 497:477–497, 2003. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1415-47572003000400012>.

HARAHAP, S. M. et al. Relation ship of ethylene production and aerenchyme formation on oxidation ability and root surfaced-Iron (Fe^{2+}) accumulation under different iron concentrations and rice genotypes. **International Journal of Applied Science and Technology**. v. 4, p. 186–194, 2014.

HE, W. et al. Availability and toxicity of Fe (II) and Fe (III) in CaCO_2 cells. **J Zhejiang Univ Sci B**. v. 9, p. 707–712, 2008. DOI:10.1631/jzus.B0820023.

HELL, R.; STEPHAN, U.W. Iron uptake, trafficking and homeostasis in plants. **Planta**. v. 266, p. 541-55, 2003. DOI: 10.1007/s00425-002-0920-4.

BALK, J.; SCHAEDLER. T. A. Iron cofactor assembly in plants. **Annu. Rev. Plant Biol.** v. 65, p. 125-53, 2014.

LONDO, J. P. et al. Phylogeography of Asian wild rice, *Oryza Rufipogon*, reveals multiple independent domestications of cultivated rice, **PNAS**. v. 103, n. 25, p. 9578-83, 2006.

KOBAYASHI, T.; NISHIZAWA, N.K. Iron uptake, translocation, and regulation in higher plants. **Annu Rev Plant Biol.**, v 63, p 131–152, 2012. DOI:10.1146/annurev-arplant-042811-105522.

KÖGEL-KNABNER, I. et al. Biogeochemistry of paddy soils. **Geoderma**. v. 157, p. 1–14, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2010.03.009>.

LI, G. et al. Ethylene is critical to the maintenance of primary root growth and Fe homeostasis under Fe stress in *Arabidopsis*. **Journal of Experimental Botany**, v. 66, n. 7, p. 2041–2054, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1093/jxb/erv005>.

LIU, W.J. et al. Do phosphorus nutrition and iron plaque alter arsenate (As) uptake by rice seedlings in hydroponic culture? **New Phytol.** v. 162, p. 481–488, 2004. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2004.01035.x.

LÓPEZ-MILLÁN, A. F.; DUY, D.; PHILIPPAR, K. Chloroplast Iron Transport Proteins – Function and Impact on Plant Physiology. **Front Plant Sci.** v. 7, p. 1–12, 2016. DOI: 10.3389/fpls.2016.00178.

LUX, A. et al. Root response to cadmium in the rhizosphere: a review. **Journal of Experimental Botany.** v. 62, p. 21-37, 2011. DOI:10.1093/jxb/erq281.

MACLEAN, J. L. et al. **Rice Almanac.** CABI Publishing, Wallingford, UK, 2002, 253p.

MACOVEI, A.; GILL, S. S.; TUTEJA, N. microRNAs as promising tools for improving stress tolerance in rice. **Plant Signal Behav.** v. 7, n. 10, p. 1296–130, 2012. DOI: 10.4161/psb.21586.

MAGALHÃES, J. A. M. et al. Aspectos genéticos, morfológicos e de desenvolvimento de plantas de arroz irrigado. In: GOMES, A. S.; MAGALHÃES JÚNIOR, A. M. Arroz irrigado no Sul do Brasil. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, p. 143- 160, 2004.

MEI, X. Q. et al. The effects of radial oxygen loss on arsenic tolerance and uptake in rice and on its rhizosphere. **Environmental Pollution.** v. 165, p. 109–117, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2012.02.018>.

MENDES, I. C.; REIS JUNIOR, F. B. Microrganismos e disponibilidade de fósforo (P) nos solos: uma análise crítica. Planaltina, Embrapa Cerrados, 2003. 26 p, (Embrapa Cerrados, Documentos 85).

MORRISSEY, J.; GUERINOT, M. L. Iron uptake and transport in plants: The good, the bad, and the ionome. **Chem Rev.** v. 109, n. 10, p. 4553-4567, 2009. DOI: 10.1021/cr900112r.

MULLER, C. et al. Physiological responses in rice upon exposure to excess distinct iron forms. **Plant and Soil.** v. 391, n. 1-2, p. 123–138, 2015.

NANZYO, M. et al. Formation of iron plaque and vivianite on the roots of paddy rice. **19 th World Congr Soil Sci Soil Solut a Chang World 1.** p 82–85, 2010.

PEZESHKI, S. R.; DELAUNE, R. D. Soil oxidation-reduction in wetlands and its impact on plant functioning. **Biology (Basel).** v. 1, p. 196–221, 2012. DOI:10.3390/biology1020196.

PONNAMPERUMA, F. N. Eletrochemical changes in submerged soils and the growth of rice. In: Soils & rice. Los Baños, Philippines, IRRI, p. 421-441, 1978.

PONNAMPERUMA, F.N. The chemistry of submerged soils. **Adv Agron,** v 24, p 29–96, 1972. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(08\)60633-1](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(08)60633-1).

SAHRAWAT, K. L. Iron toxicity in wetland rice and the role of other nutrients. **Journal of Plant Nutrition**. v. 27, p. 1471-1504, 2004. DOI: <http://dx.doi.org/10.1081/PLN-200025869>.

SAHRAWAT, K. L. Managing iron toxicity in lowland rice: the role of tolerant genotypes and plant nutrients. **Journal of Plant Nutrition**. v 1, p. 452-454, 2004.

SAHRAWAT, K. L. Reducing iron toxicity in lowland rice with tolerant genotypes and plant nutrition. **Plant Stress**. v. 4, p. 70-75, 2010.

SANCHEZ, C. A. **Phosphorus**. In: BARKER, A.V.; PILBEAM, D.J. (eds). Handbook of plant nutrition. Boca Raton: Taylor & Francis Group, p.51-90, 2007.

SANTOS, A. B.; STONE, L.S.; VIEIRA, N. R.A. **A cultura do arroz no Brasil**, 2º Ed. Santo Antonio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2006.

SCHACHTMAN, D. P.; REID R. J.; AYLING, S. M. Update on phosphorus uptake phosphorus uptake by plants. **From Soil to Cell**. p. 447-453, 1998.

SCHMIDT, F. et al. O. Impacto do manejo da água na toxidez por ferro no arroz irrigado por alagamento. **Rev Bras Cienc do Solo**. v. 7, p. 1226-1235, 2013.

SCHMIDT, F. **Manejo da irrigação por alagamento e a toxidez por ferro no arroz cultivado em casa de vegetação**. 2009. 86p. (Dissertação de mestrado)- Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2009.

SHAHANDEH, H.; HOSSNER, L. R.; TURNER, F. T. Phosphorus relationships to manganese and iron in rice soils. **Soil Sci**. v. 168, p. 489-500, 2003.

SOSBAI. **Arroz Irrigado: Recomendações técnicas da pesquisa para o sul do Brasil**. Bento Gonçalves, RS, 2014. 192p.

SOUSA, R. O.; GOMES, A. S.; VAHL, L. C. Toxidez por ferro em arroz irrigado. In: GOMES, A da S. e MAGALHÃES JÚNIOR, A. M. de (eds.). **A cultura do arroz irrigado no Sul do Brasil**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, p. 305-334, 2004.

SOUSA, R.; CAMARGO, F. O.; VAHL, L. C. **Solos Alagados (Potencial Redox)**. In: Fundamentos da Química dos Solos 4ºEd. Meurer E.J. Editor. Porto Alegre: Evangraf, p 172, 2010.

STEIN, R. J. **Excesso de Ferro em arroz (*Oryza sativa* L.): efeitos tóxicos e mecanismos de tolerância de distintos genótipos**, 2009. 197p. (Tese de Doutorado)-Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2009.

STEIN, R. J.; LOPES, S. I. G.; FETT, J. P. Iron toxicity in field-cultivated rice: Contrasting tolerance mechanisms in distinct cultivars. **Theor Exp Plant Physiol.** v. 26, p. 135–146, 2014.

ULLRICH-EBERIUS, C. I. et al. Relationship between energy dependent phosphate uptake and the electrical membrane potential in *Lemna gibba* G1. **Plant Physiol.** v. 67, p. 797–801, 1981.

ULLRICH-EBERIUS, C. I.; NOVACKY, A.; VAN BEL, A. J. E. Phosphate uptake in *Lemna gibba* G1: energetics and kinetics. **Planta.** v. 161, p. 46–52, 1984.

VANCE, C. P.; UHDE-STONE, C.; VANCE, C. P. Phosphorus acquisition and use : critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. **New Phytologist.** v. 157, p. 423–447, 2003. DOI: 10.1046/j.1469-8137.2003.00695.x.

VAUGHAN, D. A. **The genus *Oryza sativa* L. current status of taxonomy.** The International Rice Research (IRPS), n. 138, 1989.

WANG, C. A. et al. Effects of amount of nitrogen, phosphorus and potassium fertilizaer application on yield and quantity of rice. **J Jilin Agric Sci.** v. 35, n .1, p. 28-33, 2010.

WARD, J. T. et al. The effect of iron on the primary root elongation of arabidopsis during phosphate deficiency. **Plant Physiol.** v. 147, n. 3, p. 1181–1191, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.108.118562>.

WEBER, K. A.; ACHENBACH, L. A.; COATES J. D. Microorganisms pumping iron: Anaerobic microbial iron oxidation and reduction. **Nat. Rev. Microbiol.** v. 4, p. 752–764, 2006. DOI:10.1038/nrmicro1490.

WOLTER, R. C. D. Prognóstico da toxidez de ferro em arroz irrigado por alagamento através da análise de solo pelo método oxalato de amônio. 2010. 83 p. Dissertação (Mestrado em Solos)- Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

XING, C. H. et al. Developmental characteristics and response to iron toxicity of root border cells in rice seedlings. **Journal of Zhejiang University Science.** v. 9, n. 3, p. 261–264, 2008. DOI: 10.1631/jzus.B0710627.

YADAVALLI, V. et al. Differential degradation of photosystem I subunits under iron deficiency in rice. **J Plant Physiol.** v. 169, p. 753–759, 2012. DOI: 10.1016/j.jplph.2012.02.008.

ZHANG, X.; ZHANG, F.; MAO, D. Effect of iron plaque outside roots on nutrient uptake by rice (*Oryza sativa* L.): Phosphorus uptake. **Plant Soil.** v. 209, p. 187-192, 1999.

ZHANG, Y. et al. Morphological and physiological responses of root tip cells to Fe²⁺ toxicity in rice. **Acta Physiol Plant**. v. 33, n. 3, p. 683–689, 2011.

ZHANGA, Y. et al. Effect of toxic Fe²⁺ levels on the biological characteristics of rice root border cells. **Journal of Plant Physiology**. v. 6, p. 766–771, 2012.

ZHU, X. F. et al. Pectin enhances rice (*Oryza sativa* L.) root phosphorus remobilization. **J Exp Bot**. v. 66, n. 3, p. 1017-1024, 2015. DOI:10.1093/jxb/eru461.