

ALYNE OLIVEIRA LAVINSKY

**EFEITO DO SILÍCIO NA ANATOMIA RADICULAR E NA PRODUÇÃO DE
GRÃOS DE ARROZ**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2013**

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV

T

L412e
2013

Oliveira Lavinsky, Alyne, 1983-
Efeito do silício na anatomia radicular e na produção de
grãos de arroz / Alyne Oliveira Lavinsky. – Viçosa, MG, 2013.
x, 82f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Fábio Murilo DaMatta.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Arroz - Anatomia. 2. Arroz - Efeito do silício.
3. Fotossíntese. 4. Exames pelo raio X. 5. Silício. 6. Bioquímica.
7. Fisiologia vegetal. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Biologia Vegetal. Programa de Pós-Graduação
em Fisiologia Vegetal. II. Título.

CDD 22. ed. 633.18

ALYNE OLIVEIRA LAVINSKY

**EFEITO DO SILÍCIO NA ANATOMIA RADICULAR E NA PRODUÇÃO DE
GRÃOS DE ARROZ**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 16 de agosto de 2013.

Prof. Fabrício Ávila Rodrigues
(Coorientador)

Prof. Wagner Luiz Araújo
(Coorientador)

Kelly da Silva Coutinho Detmann

Paulo César Cavatte

Fábio Murilo DaMatta
(Orientador)

Dedico aos meus exemplos de vida, Eduardo C ezar e Rita Lavinsky, que sempre me estimularam e me apoiaram nessa caminhada. Ao meu amado noivo, companheiro e amigo, com quem pude contar durante esses anos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida e pela presença constante. Obrigada meu senhor por iluminar meus passos e me sustentar nos momentos difíceis;

Aos meus pais, Eduardo César e Rita de Cássia, e a minha irmã Manuella, pelo exemplo, amor, cuidado e compreensão, sem contar a felicidade de tê-los envolvidos no planejamento, condução e avaliações experimentais (preciosos);

Ao meu noivo Leandro Oliveira, pelo amor, cuidado, compreensão e momentos de descontração que fizeram toda a diferença nessa etapa, e motivou a vontade de terminar essa etapa para dar início a uma nova, com direito a chuva de arroz;

Ao CNPq, pela bolsa de estudos recebida e, em adição, a uma taxa de bancada para compra de produtos e estrutura importantes para o desenvolvimento do estudo; nesse contexto, agradeço ao povo brasileiro, por financiar os meus estudos, por meio de seus esforços e impostos, meu eterno respeito e gratidão.

Ao Prof. Fábio Murilo DaMatta, pelo exemplo, confiança depositada, puxões de orelha nos momentos em que precisei, paciência, ensinamentos transmitidos, oportunidade de aprendizado em seu laboratório e preciosa orientação para a conclusão desse trabalho;

Aos meus co-orientadores, os professores Fabrício Ávila Rodrigues e Wagner Araújo (Waguinho!), pela acolhida, cuidado, ensinamentos transmitidos, e orientações constantes;

A todos integrantes do grupo arroz/café do Laboratório de Nutrição e Metabolismo de Plantas da UFV: Alicinha, Gustavo, Leandro Elias, Leandro Tavares, Josimar, Kelly, Lílian, Lucas, Matheus, Mariela, Mathielly, Marco Antônio, Nelson, PC Cavatte, Paulo Eduardo, Rodrigo, Samuel, e Yesid, pela amizade, riso e constantes ajudas. Em especial, ao Gustavo, que ingressou no curso comigo; a Kelly, que cedeu amostras de folhas de arroz de seu antigo experimento para condução do experimento 2 do capítulo 1; Samuel, PC e Nelson, pelos ensinamentos transmitidos, conselhos e entusiasmo; Lili, que cedeu algumas curvas para correção de vazamentos da câmara do IRGA; e aos queridos bolsistas de IC: Josimar, Lucas, Matheus e Rodrigo, que estiveram diretamente envolvidos na execução da pesquisa, seja na discussão de alguns resultados obtidos, seja na parte laboratorial e/ou nas infinitas trocas de solução nutritiva, com tanto empenho, dedicação e alegria; Foi um orgulho muito grande, participar, de algum modo, na formação de vocês como futuros pesquisadores!

Aos também integrantes de nosso laboratório: Danny Brito, Franklin, Izabel, Jorge, Josélia, Laíse, Paulinha e Rebeca; ao infiltrado argentino Ignácio; ao pessoal da cultura de tecidos, Antoninho Cordeiro, Fernanda, Kátia, Lucilene, Sanzio e Talita, pelo agradável convívio e companhia; ao Carlos Raimundo e ao querido Geraldo Marreco, pelo cuidado com o laboratório e “pretinho” tão gostoso toda manhã, sem contar as suas inúmeras histórias divertidas; Não posso desconsiderar a presença permanente dos queridos Dora, David (Beckham) e João;

A toda turminha boa que tive o prazer de conviver durante a realização do experimento na UCP, obtenção de dados de biologia molecular no Laboratório de Fisiologia Molecular, e de anatomia no Laboratório de Fitopatologia: Alice, Ana Carla, Alberto, Alessandro, Carlos, Camilo, Danilo, Dalton, Daniel, Débora, Fabiana, Franciele, Jonas, Giuliana, Gomide, Kallyne, Leonardo, Maria Cardona, Maria Fernanda, Renan, Renata, Renato, Rinamara, Rosilene, Sabrina, Vitor, Willer e Wilka; e dos funcionários da obra da UCP, pelo cuidado comigo e com o experimento, especialmente sr. Pires;

Aos amigos do curso/UFV, em especial: Leonardo Araújo, tanto me ajudou no preparo das amostras para os estudos de anatomia, como ensinou a utilizar todos os equipamentos necessários no lab. de Fitopatologia; meus pais, Rita e César Lavinsky e minha irmã de coração, Dra. Rosilene Mesquita (Rosita), que ajudaram na estruturação, condução e avaliações experimentais, além dos inúmeros chás da tarde e idas à feira aos sábados para comer pastel; Dra. Alice Pita (Ô Pizza!), amiga sempre presente, parceira até em experimentos paralelos com Viagra® e arsênio, pelos momentos inesquecíveis de tão divertidos, além da confecção das pranchas anatômicas e orientações constantes; Paula Pereira (Paulinha!!!) que estava pra defender mestrado e parou um pouco as suas atividades para ajudar, juntamente a mim e a comadre Sabrina Helena na contagem de 48 mil grãos de arroz no final do ano (espero que o prof. Adriano nunca leia isso); A também comadre e companheira de república Fernanda Farnese, pelas muitas conversas divertidas, jantares com “explosão de sabores” e incontáveis conselhos nesses dois anos de convivência. Também sentirei muita falta do pequeno Tchite e do sauron do Paulete; Renan e Dra. Débora, que têm um coração imenso e já passaram até madrugada comigo avaliando experimento; Dr. Danilo Daloso, companheiro de almoço diário e de riso, que ajudou na busca de genes homólogos do arroz em *Arabidopsis* - “tá errado! volta e faz de novo...”; João Henrique Frota, que ensinou a manusear programas de bioinformática para estudos de interatoma; Camilo, que ensinou a manusear o *Miner*; Rodrigo, *the*

new starch man, por tudo!!!; Valéria Fernandes, Marthielly Santana, e Danny Brito, cadinho da Bahia em Viçosa; Wedisson dos Santos, pelo cuidado e confiança de sempre, sem contar as suas constantes vistorias na casa de vegetação para controle de pragas/doenças; Rogério Gomide, parceiro de inventos e de conversa fiada, sempre tão disposto a ajudar da melhor forma possível, e acolhimento junto a sua família no Natal; Samuel Cordeiro, pelos mil ensinamentos sobre g_m e estudo dos componentes que limitam a fotossíntese; PC, que sempre lia a palavra do dia, e era meu companheiro de bancada; Letícia dos Anjos, pelos conversas divertidas, companhia e conselhos em momentos de dificuldade “Por que no final você vai perceber que a tese é o menos importante”. Por fim, não menos importante, o querido amigo Josimar, que tanto me ajudou, seja braçal, intelectual ou espiritualmente. Vocês são muito especiais para mim!

Aos funcionários da secretaria, Ângelo, Luciene e Mauro, e do laboratório de aula prática, Sr. Oswaldo, Sr. Reginaldo e Zé Antônio, ao pessoal da portaria do prédio, que recebem todos os estudantes com tanto carinho, alegria e presteza. Também, a Rita Elaine e Rosa/João Bosco que cuidam tão bem das dependências do departamento e da UCP, respectivamente;

A todos os professores do curso, aqui representados pelos profs. Adriano Nunes-Nesi, Marcelo Loureiro e Raimundo Santos Barros, não apenas pelos conhecimentos transmitidos, mas pela atenção, fornecimento de reagentes, receptividade e bênçãos em nome de Tabatã (este último é exclusivo ao querido prof. Raimundo); Aproveito também para agradecer aos profs. Fábio Pinto Gomes e Marcelo Schramm Mielke, pelo importante papel em minha formação.

Ao Núcleo de Microscopia e Microanálise da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, MG, Brasil (www.nmm.ufv.br), representado pelos seus técnicos Gilmar, Carla e Arthur, pelas realizações de análises envolvendo microscopia eletrônica (MEV e EDS) com tanta presteza e alegria.

SUMÁRIO

	Pg.
RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	ix
Introdução geral.....	1
Referências.....	4
Capítulo 1: A produção de grãos em plantas de arroz aumenta quando o silício é especificamente adicionado na fase de formação da panícula: uma abordagem fisiológica.....	6
1 Introdução.....	6
2 Materiais e métodos.....	10
3 Resultados.....	20
4 Discussão.....	24
Referências.....	28
Capítulo 2: O silício controla a formação da placa de ferro e da barreira contra a perda radial de oxigênio em raízes de arroz.....	51
1 Introdução.....	51
2 Materiais e métodos.....	54
3 Resultados.....	60
4 Discussão.....	62
Referências.....	66
Conclusão.....	82

RESUMO

LAVINSKY, Alyne Oliveira, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2013.
Efeito do silício na anatomia radicular e na produção de grãos de arroz.
Orientador: Fábio Murilo DaMatta. Coorientadores: Fabrício Ávila Rodrigues e Wagner Luiz Araújo.

O silício (Si) é um dos elementos mais abundantes na crosta terrestre, e, devido à sua abundância no solo e à ausência de sintomas de deficiência ou toxidez, depreende-se que os benefícios da fertilização com Si sejam mínimos e/ou inexistentes, exceto quando as plantas são submetidas a algum tipo de estresse. No entanto, o uso intensivo do solo associado à aplicação de fertilizantes químicos tem conduzido a um esgotamento de Si no solo, e num futuro a deficiência de Si no solo poderá ser um grande limitante à produção, pelo menos em arroz (*Oryza sativa*). Ao avaliar o efeito da remoção e da adição de Si no período vegetativo (V) e nos estádios do ciclo reprodutivo correspondentes à formação da panícula (R1) e ao enchimento de grãos (R2), observou-se que plantas fertilizadas com Si durante R1 apresentaram maior número e massa de grãos em relação às plantas fertilizadas com Si apenas em V e/ou R2; além disso, não houve alteração do número de panículas, da área foliar e da biomassa total e, conseqüentemente, observou-se um aumento de 61% no índice de colheita nas plantas suplementadas com Si no estágio R1. Houve ainda maior número de grãos cheios e maior massa de mil grãos nessas plantas. Ressalta-se, inclusive, que o Si é tão necessário durante a formação da panícula que as plantas que receberam Si a partir de R1 superexpressaram o gene *Lsi6*, possivelmente para garantir concentração de Si na panícula equivalente à daquelas que o receberam desde o período vegetativo do ciclo. O aumento da demanda dos drenos fez aumentar em 15% a atividade fotossintética na folha-bandeira, muito provavelmente para sustentar a maior demanda por fotoassimilados durante o enchimento dos grãos. Houve uma antecipação no enchimento dos grãos com a fertilização com Si durante R1, o que fez com que a sacarose acumulada fosse deslocada para o eixo embrionário, aumentando, assim, a área ocupada pelo embrião. Além disso, evidenciou-se que o Si afeta de alguma forma a atividade da anidrase carbônica (AC) e a abundância de aquaporinas, existindo interação entre AC com três genes que codificam para transportadores de ácidos orgânicos nas células-guarda e um gene que codifica para um gene envolvido na ativação da enzima carboxilase/oxigenase da Ribulose-1,5-bisfosfato (RuBisCO), o que corrobora os

maiores valores de taxa máxima de carboxilação limitada pela Ribulose-1,5-bisfosfato e de taxa máxima de carboxilação limitada pela taxa de transporte de elétrons em plantas fertilizadas com Si durante R1. Apesar de a maior parte do Si absorvido ser transportado para a parte aérea via fluxo transpiracional, o pequeno percentual de Si retido na raiz também possui um papel importante nesse tecido. O fornecimento de Si aumentou a atividade da fenilalanina amônia liase e fez estimular a suberização da exoderme e a lignificação do esclerênquima nos tecidos radiculares, formando, assim, uma barreira contra a perda radial de O₂ (PRO), o que, por sua vez, afetou a quantidade de aerênquima, dentre outras características anatômicas no ápice da raiz. Em paralelo, mediante análise de varredura associada com sonda de microanálise de elementos por raios-X, foi verificado na superfície da raiz de plantas tratadas com Si um aumento de 4,10 vezes na deposição de Fe, enquanto a deposição de Ca foi diminuída em 57,8% em relação à daquelas em que o Si não foi fornecido. As concentrações tanto de Fe como de Ca solúveis nos espaços intercelulares da raiz, medidos por espectrometria de absorção atômica, por sua vez, foram diminuídas em presença de Si. Desse modo, o fornecimento de Si é necessário não apenas para aumentar o rendimento em grãos do arroz, mas também por promover a formação simultânea de barreira contra a PRO e da placa de Fe em raízes de plantas de arroz, que, por sua vez, impõe mudanças compensatórias na morfologia radicular para conferir uma presumível maior tolerância às condições adversas do ambiente de cultivo, com pouco efeito na absorção de Si.

ABSTRACT

LAVINSKY, Alyne Oliveira, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August 2013. **The effects of silicon on root anatomy and grain yield of rice.** Adviser: Fábio Murilo DaMatta. Co-advisers: Fabrício Ávila Rodrigues and Wagner Luiz Araújo.

Silicon (Si) is one of most abundant element in Earth crust. All plants grown in soil contain some Si in their tissues, and due to the widespread abundance of this element in nature and non-apparent visible symptoms of either deficiency or toxicity, Si is often assumed to be biologically unreactive and it is not considered as an essential element for higher plants, except under stressful condition. However, repeated cropping and constant application of chemical fertilizers have depleted the amount of Si that is available to plants in the soil. An awareness of Si deficiency in soil has been now recognized as a limiting factor for crop production particularly in soils that are deemed to be low or limiting in plant available Si for known Si-accumulating species such as rice (*Oryza sativa*). The effects of removal or addition of Si during the vegetative (V) or reproductive growth stages (corresponding to panicle formation (R1) or grain filling (R2)) on the rice grain production and physiological related traits were evaluated. It was found that Si fertilization during R1 played a pivotal role in the enhanced number and mass of rice grains, with little, if any, significant impact of this element on grain yield when supplied during V and/or R2 stages; regardless of treatments, the panicle number, leaf area and total biomass remained unaltered. Consequently, the harvest index increased by 61% (coupled to higher percentage of filled spikelets and grain mass) in plants supplied with Si during R1 in relation to the others groups. There was a much higher number of filled grains and 1000-grain weight in these plants. Noteworthy, Si is essential during panicle formation and plants that received Si during R1 overexpressed the gene *Lsi6*, possibly to ensure Si concentration in panicle similar those found in Si-fertilized plants since the beginning of growth cycle. Increased grain yield led to improvements of the source capacity through a feed-forward stimulation of 15% on photosynthetic rates of the flag leaf, probably to support increased sink demand coupled with anticipation of grain filling, which, in turn, shifted sucrose accumulated to embryo, increasing embryo area. Furthermore, it was shown that Si, to some extent, affected the carbonic anhydrase (CA) activity and aquaporin abundance; it was also depicted an existing interaction between CA and three genes encoding for transporters of organic acids in the guard cells, and one gene associated with the activation of the enzyme

RuBisCO, in agreement with the highest values of maximum rate of carboxylation limited by Ribulose-1,5-bisphosphate and maximum rate of carboxylation limited by electron transport in Si-fertilized plants during R1. Therein the root tissues, Si fertilization increased phenylalanine ammonia liase and led to increased suberization of the exodermis and lignification of the sclerenchyma, which collectively may act to form a barrier against radial O₂ loss (PRO) of the root tissues. In addition, Si affected the extent of aerenchyma. In parallel, scanning electron microphotographs associated with X-ray energy dispersive spectroscopy revealed that Fe deposition increased four-times on root surface of Si-fertilized plants, while the deposition of Ca was decreased by 58% compared to their counterparts not challenged with Si. In turn, the root concentrations of Fe and Ca, measured by atomic absorption spectrometry, were reduced in Si-fertilized plants. From the above, it is proposed that Si fertilization is necessary not only to increase productivity, but also to promote simultaneous formation of barrier against PRO and Fe plaque in rice roots, which in turn imposes compensatory changes in root morphology to increase hypoxia tolerance, with little effect on Si absorption.

INTRODUÇÃO GERAL

Historicamente, diversos experimentos em condição de laboratório, casa de vegetação, e mesmo em campo, têm sido realizados para demonstrar se a fertilização com silício (Si) é de fato necessária para o aumento na produtividade de plantas, principalmente em monocotiledôneas, como é o caso do arroz (Ohkawa, 1936; Ma et al., 1989; Detmman et al., 2012); tais estudos, em sua maioria, evidenciam que a fertilização com Si é necessária em situações de estresse, por conferir às plantas uma maior proteção contra doenças, pragas e condições climáticas desfavoráveis (Epstein, 1999; Ma e Takahashi, 2002; Richmond e Sussman, 2003), mas seria supérflua quando as plantas são cultivadas na ausência de estresse, uma vez que esse elemento é encontrado em abundância no solo (Ma e Yamaji, 2006). O uso intensivo do solo, associado com a constante aplicação de fertilizantes químicos, tem conduzido a uma depleção na quantidade de Si disponível no solo para as plantas e, num futuro próximo, a deficiência de Si no solo poderá ser um grande limitante à produção, pelo menos em arroz (Ma et al., 1989; Ma e Yamaji, 2006). Contudo, os mecanismos pelos quais esse elemento afeta a fisiologia das plantas, culminando em aumentos na produção de grãos, continuam ainda pouco conhecidos.

As primeiras pesquisas para a identificação do papel fisiológico do Si foram baseadas na cultura do arroz, e concluiu-se que as plantas suplementadas com Si tinham maior biomassa, folhas mais eretas e apresentavam maior rendimento de grãos em comparação às não suplementadas (Ohkawa, 1936; Okamoto et al., 1956). Atualmente, a hipótese mais aceita para o efeito do Si é de que esse elemento aumenta a produtividade do arroz por permitir o desenvolvimento de folhas mais eretas, que intensificariam a fotossíntese da planta inteira, por melhorar a distribuição luminosa ao longo da copa (Takahashi et al., 1990; Epstein, 1999), uma vez que o ângulo foliar influencia o grau de saturação luminosa das folhas superiores (Yoshida, 1981), e a quantidade de luz absorvida, por alterar a refletância, a absortância e a área foliar atingida (He et al., 1996). Nesse contexto, além de proporcionar melhor distribuição luminosa ao longo da planta, folhas mais verticalizadas em relação ao solo poderiam não chegar à saturação luminosa durante todo seu ciclo diurno ou, então, passariam pouco tempo expostas ao estresse luminoso, resultando, portanto, em maior fotossíntese na planta inteira.

Embora, em primeira instância, a hipótese de modificação do ângulo foliar anteriormente apresentada pareça suportável, resultados experimentais (Takahashi et al., 1966; Ma, 1989) indicam que a alteração do ângulo foliar não explicaria totalmente os efeitos do Si sobre a produtividade. Em estudos independentes, Takahashi et al. (1966) e Ma (1989) não encontraram diferença significativa no crescimento de plantas de arroz fertilizadas com ou sem Si durante o período vegetativo. Ma et al. (1989) verificaram que plantas de arroz suplementadas com Si somente no período reprodutivo apresentaram massa de panícula similar à das sem Si durante todo o ciclo. Com efeito, Watanabe et al. (2004) demonstraram que, durante o período vegetativo, o Si não alterou o perfil de expressão de genes relacionados com o metabolismo em arroz, exceto em condição estressante. Por sua vez, plantas cultivadas em presença constante de Si apresentaram número de grãos similar ao de plantas suplementadas com Si apenas a partir do período reprodutivo. Como o Si é um elemento imóvel nas plantas, e o arroz tem crescimento anual, as plantas suplementadas com esse elemento, somente na fase reprodutiva, não apresentaram folhas mais eretas do que as suplementadas com Si desde o início do ciclo. Assim, tais resultados são contrários, pelo menos aparentemente, com a hipótese de que a modificação do ângulo foliar seja o único responsável pelo aumento da produtividade do arroz pela adição de Si. Tomados em conjunto, esses resultados sugerem que o Si só afeta a produção de grãos quando presente durante o período reprodutivo, embora não se tenha enfatizado as razões pelas quais a adição de silício no estágio reprodutivo aumentaria a produtividade.

No arroz, os genes *Low silicon rice 1* e *2* (*Lsi1* e *Lsi2*) codificam para isoformas de aquaporinas que atuam na absorção do Si, na forma de ácido monossilícico (H_4SiO_4), pelas raízes (Ma e Takahashi, 2002). Após absorvido pelas raízes, o Si se move apoplásticamente por fluxo transpiracional no xilema da raiz para a parte aérea, onde, então, é polimerizado na parede celular dos tecidos fotossintéticos, na forma de sílica (Ma et al., 2006). Sugere-se, aqui, que a barreira formada pela deposição de Si na parede celular restrinja paulatinamente a continuidade ao movimento apoplástico desse elemento, que é, então, acumulado, em última instância, nos tecidos radiculares, formando placas de Si, que poderiam, além de inibir o crescimento radicular, conduzir ao fechamento do canal de absorção, o que comprometeria a continuidade da absorção deste elemento pelas raízes (mecanismo de retroinibição por Si). No entanto, o arroz é uma planta que, em algumas cultivares, adapta-se ao alagamento via formação de aerênquima e de uma barreira à perda radial de oxigênio nas raízes (PRO), aumentando

a quantidade de aerênquima no ápice radicular (Drew et al., 2000; Abiko et al., 2012), o que permitiria que a demanda de energia (*pool* de carboidratos), outrora direcionada para absorção de Si, fosse realocada na parte aérea, a expensas de um menor crescimento axial radicular. Fleck et al. (2011) verificaram que o Si *per se* pode acelerar a formação de uma barreira contra a PRO, ainda que na ausência de estresse, sem afetar o crescimento axial radicular. Além disso, a PRO pode ser benéfica por oxidar compostos contendo Fe na superfície da raiz, diminuindo, assim, a absorção desse elemento em níveis tóxicos (Hodge et al., 2009). Levando-se em conta tais informações, acredita-se que a formação da barreira contra a PRO atuaria sinergisticamente com placas de Fe para diminuir a absorção demasiada de Fe em raízes de plantas de arroz fertilizadas com Si, promovendo mudanças anatômicas e fisiológicas que permitiriam aumentos na capacidade do arroz em suportar ainda mais a estresses. Essas questões têm relevância para o entendimento dos mecanismos de transporte de Si que permitem aumentos no índice de colheita de plantas fertilizadas com Si no período reprodutivo do ciclo fenológico do arroz. Caso o transporte de H_4SiO_4 seja afetado nesse momento do ciclo, a produtividade do arroz poderia ser comprometida (Ma et al., 1989).

Esta tese está dividida em dois capítulos. No primeiro, buscou-se caracterizar os mecanismos pelos quais o Si aumenta a fotossíntese e a produção de grãos em arroz, especificamente quando esse elemento é fornecido na fase de formação da panícula, tentando-se compreender possíveis mecanismos associados nesse contexto. No segundo capítulo, o foco de trabalho foi centrado na raiz, na tentativa de atribuir um papel fisiológico para o Si, em nível radicular.

REFERÊNCIAS

- Detmann, K. C.; Araújo, W. L.; Martins, S. C.; Sanglard, L. M.; Reis, J. V.; Detmann, E.; Rodrigues, F. Á.; Nunes-Nesi, A.; Fernie, A. R.; DaMatta, F. M. Silicon nutrition increases grain yield, which, in turn, exerts a feed-forward stimulation of photosynthetic rates via enhanced mesophyll conductance and alters primary metabolism in rice. **New Phytologist** **196**: 752 - 762, 2012.
- Epstein, E. Silicon. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology** **50**: 641 - 664, 1999.
- Fleck, A. T.; Nye, T.; Reppening, C.; Stahl, F.; Marc Zahn, F. M.; Schenk, M. K. Silicon enhances suberization and lignification in roots of rice (*Oryza sativa*). **Journal of Experimental Botany** **62**: 2001 - 2011, 2011.
- He, J.; Chee, C. W.; Goh, C. J. Photoinhibition of *Heliconia* under natural tropical conditions: the importance of leaf orientation for interception and temperature. **Plant, Cell and Environment** **19**: 1238 - 1248, 1996.
- Hodge, A.; Berta, B.; Doussan, C.; Merchan, F.; Crespi, M. Plant root growth, architecture and function. **Plant and Soil** **321**: 153 - 187, 2009.
- Ma, J. F. Role of silicon in enhancing the resistance of plants to biotic and abiotic stresses. **Soil Science Plant Nutrition** **50**: 11 - 18, 2004.
- Ma, J. F.; Nishimura, K.; Takahashi, E. Effect of silicon on the growth of rice plant at different growth stages. **Soil Science Plant Nutrition** **35**: 347 - 356, 1989.
- Ma, J. F.; Takahashi, E. **Soil, Fertilizer, and Plant Silicon Research in Japan**. Elsevier Science: Amsterdam, 2002. 294 p.
- Ma, J. F.; Tamai, K.; Yamaji, N.; Mitani, N.; Konishi, S.; Katsuhara, M.; Ishiguro, M.; Murata, Y.; Yano, M. A silicon transporter in rice. **Nature** **440**: 688 - 691, 2006.
- Ohkawa, K. Studies on plant physiological function of silica. **Japanese Journal of Soil Science and Plant Nutrition** **10**: 96 - 101, 1936.
- Ma, J. F.; Yamaji, N. Silicon uptake and accumulation in higher plants. **Trends in Plant Science** **11**: 1 - 6, 2006.
- Okamoto, Y.; Fujimaki, T.; Aoki, S. Physiological studies of the effects of silicic acid upon rice plant I. **Memoirs of the Faculty of Liberal Arts & Education**: 177 - 180, 1956.
- Richmond, K. E.; Sussman, M. Got silicon? The non-essential beneficial plant nutrient **Current Opinion in Plant Biology** **6**: 268 - 272, 2003.

Takahashi, E. Uptake mode and physiological functions of silica. In: Takahashi, E.; Hoshikawa, K. (Eds.) **Science of the rice plant: Physiology**. Tokyo: Food and Agriculture Policy Research Center, 1990. p. 420 - 433.

Takahashi, E.; Arai, K.; Kashida, Y. Studies on the physiological role of silicon in crop plant. Part 14 Effect of silicon on the assimilation and translocation of CO₂ supplied at the various growth stages of rice. **Journal of the Science of Soil and Manure, Japan** **37**: 594 - 598, 1966.

Watanabe, S.; Shimoi, E.; Ohkama, N.; Hayashi, H.; Yoneyama, T.; Yazaki, J.; Fujii, F.; Shinbo, K.; Yamamoto, K.; Sakata, K.; Sakai, T.; Kishimoto, N.; Kikuchi, S.; Yamaji, N.; Mitatni, N.; Ma, J. F. A transporter regulating silicon distribution in rice shoots. **Plant Cell** **20**: 1381 - 1389, 2008.

Yoshida, S. **The Fundamental of Rice Crop Science**. The International Rice Research Institute, Los Baños, Philippines, 1981. 277 p.

CAPÍTULO 1

A PRODUÇÃO DE GRÃOS EM PLANTAS DE ARROZ AUMENTA QUANDO O SILÍCIO É ESPECIFICAMENTE ADICIONADO NA FASE DE FORMAÇÃO DA PANÍCULA: UMA ABORDAGEM FISIOLÓGICA

1. INTRODUÇÃO

Depois do oxigênio, o silício (Si) é o elemento mais abundante na crosta terrestre. Uma vez que o percentual de dióxido de silício no solo varia entre 50 e 70% (Ma e Yamaji, 2006), todas as plantas cultivadas em solos apresentam, em maior ou menor grau, alguma quantidade de Si em seus tecidos (Ma e Takahashi, 2002). No entanto, o Si é considerado um elemento biologicamente não-reativo e, portanto, não-essencial para plantas superiores. A não essencialidade do Si tem sido fortemente debatida nos últimos anos, embora as evidências sobre efeitos diretos do Si em processos catalíticos permaneçam inconclusivas. Alguns pesquisadores argumentam que os efeitos mais consistentes e positivos do Si sobre as plantas residiriam na redução dos sintomas de estresses, tanto de natureza biótica (*e.g.* patógenos e insetos) quanto de natureza abiótica (*e.g.* metais pesados, luminosidade e seca) (Ma e Yamaji, 2006; Epstein, 2009; Keeping e Reynolds, 2009; Balakhnina e Borkowska, 2013). Com efeito, a maioria dos estudos sugere que os benefícios da fertilização com Si são mínimos ou inexistentes, exceto quando as plantas são submetidas a algum tipo de estresse (Epstein, 1999).

Fauteux et al. (2006) realizaram uma análise completa de transcriptoma em plantas de *Arabidopsis* cultivadas em solução nutritiva suplementada ou não com Si, demonstrando que o Si não afeta diretamente o metabolismo dessas plantas, e os seus benefícios seriam indiretos, em função de uma maior proteção das plantas contra estresses. De fato, o Si alivia os efeitos deletérios de vários estresses abióticos devido à sua deposição na parede das células da raiz, do colmo e da folha (Fateux et al., 2006). Além disso, a barreira física formada pela deposição de Si na parede celular pode aumentar a resistência física à penetração de patógenos e, ou, permitir um maior tempo para a defesa do hospedeiro (Ma e Yamaji, 2006; Ma et al., 2011). Por outro lado, sabe-se que dicotiledôneas, a exemplo da *Arabidopsis*, não absorvem Si em quantidades elevadas. É possível que esse elemento tenha um envolvimento mais ativo em processos

fisiológicos de plantas monocotiledôneas que possuem elevada capacidade em absorver e acumular Si em seus tecidos, dentre as quais o arroz (*Oryza sativa*), que chega a acumular 10% de Si em sua massa seca (Ma e Takahashi, 2002; Ma et al., 2011).

O uso intensivo do solo, associado a constante aplicação de fertilizantes químicos, tem conduzido a uma depleção na quantidade de Si disponível no solo para as plantas e, num futuro próximo, a deficiência de Si no solo poderá ser um grande limitante à produção, pelo menos em arroz (Ma e Yamaji, 2006). Okuda e Takahashi (1961) observaram que plantas cultivadas com Si têm maior produtividade do que as cultivadas sem Si. Além disso, plantas fertilizadas com Si somente no estágio vegetativo apresentaram massa de grãos similar à de plantas sem Si durante todo o ciclo, sem afetar a arquitetura foliar. Por sua vez, o rendimento em grãos de plantas cultivadas continuamente em presença de Si foi similar ao de plantas fertilizadas com Si apenas no estágio reprodutivo. Dessa forma, sugere-se que o Si somente afetaria a produção de grãos quando presente durante a fase reprodutiva. Okuda e Takahashi (1961) observaram que os benefícios do fornecimento de Si são mais pronunciados durante o momento do ciclo em que se inicia a remobilização de nutrientes da folha para o desenvolvimento dos grãos do que quando a panícula é formada.

Posteriormente, Ma et al. (1989) avaliaram os efeitos da adição e remoção de Si no período vegetativo (do transplântio até o início da formação da panícula), na fase reprodutiva (do início da formação da panícula até a sua emissão) e de enchimento de grãos (da floração até a maturação dos grãos) em arroz, e obtiveram resultados contrastantes aos de Okuda e Takahashi (1961), no que refere ao momento do ciclo em que a fertilização com Si é mais importante. Os autores observaram que pelo menos 2/3 do Si são absorvidos durante a fase reprodutiva, e a deficiência de Si durante a formação da panícula resultou em diminuição expressiva na biomassa de grãos e no percentual de grãos cheios por panícula, enquanto a adição ou remoção desse elemento durante o período vegetativo ou durante o estágio de enchimento de grãos teve importância marginal na fertilidade. Além disso, Ma et al. (1989) encontraram efeitos positivos do Si na altura, no número de grãos por panícula, e no peso da palhada, mas não no peso de mil grãos, muito embora os autores não tenham enfatizado as razões pelas quais a adição de Si, especificamente aplicado no estágio de formação da panícula, aumenta a produtividade.

No intuito de avaliar o efeito do Si em condições não estressantes, Detmann et al. (2012) cultivaram dois genótipos de arroz (o mutante *lsi1*, defectivo para absorção

ativa de Si, e o seu respectivo tipo selvagem), verificando que a fertilização com Si aumentou o índice de colheita e a eficiência de uso do nitrogênio. Para sustentar o maior rendimento em grãos, a taxa fotossintética líquida (A) da folha-bandeira foi significativamente aumentada com a fertilização com Si. Essa resposta não foi associada com alterações na transpiração, na condutância estomática, na taxa máxima de carboxilação e nem na taxa máxima de carboxilação limitada pelo transporte de elétrons, mas sim ao aumento na condutância mesofilica (g_m). Essas respostas de curto prazo foram consistentes com o padrão de longo prazo, determinado pela discriminação isotópica de carbono, evidenciando, pela primeira vez, um efeito direto do aumento da força do dreno em g_m por mecanismos ainda desconhecidos (Detmann et al., 2012). Os mecanismos básicos que explicam as variações em g_m são dependentes da espessura e área da folha, da área superficial dos cloroplastos exposta aos espaços intercelulares, da permeabilidade da membrana plasmática e da parede celular ao CO_2 e da atividade da anidrase carbônica (Terashima et al., 2011; Tholen et al., 2011). Para espécies herbáceas como o arroz, que possuem menor espessura da parede celular e maior superfície dos cloroplastos exposta aos espaços intercelulares (Flexas et al., 2012), acredita-se que as aquaporinas tenham papel preponderante para tal aumento em g_m mediado por Si.

Em plantas, as aquaporinas são comumente subdivididas em quatro famílias: as aquaporinas localizadas na membrana plasmática (PIPs), aquaporinas localizadas no tonoplasto (TIPs), aquaporinas do tipo nodulina-26 (NIPs) e as pequenas proteínas intrínsecas (SIPs). As aquaporinas pertencentes às famílias TIP e PIP são bastante ativas no transporte de água, ao passo que a maioria das aquaporinas pertencentes às famílias das NIP e SIP não (Sakurai et al., 2005). De 33 genes identificados para arroz codificando aquaporinas (Sakurai et al., 2005), quatro deles tem a sua expressão aumentada especificamente durante o período reprodutivo do ciclo fenológico, sendo as aquaporinas OsSIP2;1 e OsTIP5;1 atuantes no transporte de água para o estigma, enquanto OsNIP4;1 e OsSIP1;1 são menos específicas, transportando, além de água, pequenos solutos para células maternas do pólen (Fujita et al., 2010). Dentre algumas pequenas substâncias transportados através de aquaporinas estão o Si (Ma et al., 2006) e o CO_2 (Terashima et al., 2011; Tholen et al., 2011). O gene *Low silicon rice (Lsi1)* codifica para uma aquaporina pertencente à família das NIP, que atua juntamente com transportador *Lsi2* na absorção do Si, na forma de ácido monossilícico (H_4SiO_4), pelas raízes do arroz (Ma et al., 2006). Posteriormente, foi provada a existência do gene *Lsi6*, um homólogo do gene *Lsi1*, que codifica para um transportador que exporta o H_4SiO_4

do xilema, redistribuindo-o para os órgãos laterais (Yamaji et al., 2008), preferencialmente para a panícula (Yamaji e Ma, 2009; Ma et al., 2011). Alguns estudos, inclusive, demonstraram que o gene *Lsi6* é expresso transitoriamente durante o período reprodutivo do ciclo fenológico do arroz, e tem sua expressão ainda mais aumentada quando o Si é fornecido após um período de escassez (Yamaji et al., 2008). Não se sabe, entretanto, se existe alguma interação entre aquaporinas e transportador de Si durante o início do período reprodutivo do ciclo. Sugere-se, aqui, que a coexpressão do *Lsi6* com aquaporinas promoveria alterações anatômicas e fisiológicas que, além de aumentar o transporte de água e de Si, poderiam ainda tornar a membrana mais permeável ao CO₂, facilitando o ingresso desse gás até o sítio de carboxilação nos cloroplastos, com reflexos em *A*. Mediante aplicação do cloreto de mercúrio (HgCl₂), que é um inibidor de aquaporinas (Aroca et al. 2001; Yukutake et al., 2008), no início do período reprodutivo, e, ou, técnicas de biologia molecular, ter-se-iam maiores subsídios para validar essa sugestão.

O presente estudo foi conduzido para compreender os mecanismos fisiológicos associados a um presumível aumento na fotossíntese e na produção de grãos em arroz, especificamente quando elemento é fornecido no estágio reprodutivo onde ocorre a formação da panícula. Considerando-se que o efeito do silício para a produtividade é expressivo na fase reprodutiva e esse não exerce, durante a fase vegetativa, nenhum efeito na fotossíntese da fonte, teve-se por hipótese que o Si interfira na força do dreno por aumentar o número de grãos durante a diferenciação da panícula, e, conseqüentemente, tendo reflexo na fotossíntese da folha-bandeira, por alterar a exigência de fotoassimilados durante o enchimento de grãos e não à maior capacidade da fonte *per se*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material vegetal e condições de cultivo

Três experimentos em condições de hidroponia, conduzidos isoladamente e analisados como tal, foram conduzidos na Universidade Federal de Viçosa (UFV) (20°45' S, 42°54' W, 650 m de altitude), no sudeste do Brasil. Em resumo, no primeiro experimento, plantas de arroz (*Oryza sativa* L. subsp. *japônica* da 'Oochikara') foram cultivadas em vasos plásticos com capacidade de 5 L contendo solução nutritiva não aerada, suplementada (+Si) ou não (-Si) com ácido monossilícico (H_4SiO_4) durante o período vegetativo (V – do transplântio até o início da formação da panícula). As plantas foram cultivadas nessa condição por 30 dias, quando, então, o início da formação da panícula foi monitorado na base do colmo, em microscópio estereoscópico do tipo lupa, a cada dois dias. Após identificação do início do período reprodutivo, que ocorreu aos 60 dias após o transplântio, metade das plantas em cada tratamento inicial (-Si e +Si) teve a sua suplementação com Si modificada (-Si/+Si e +Si/-Si), formando quatro combinações experimentais até a emissão da panícula (R1 – formação da panícula). Na segunda etapa do período reprodutivo (início do enchimento dos grãos até a maturidade – R2, aos 90 dias após o transplântio), metade das plantas em cada tratamento novamente teve a suplementação com Si modificada, formando oito combinações experimentais até o final do experimento (-Si/-Si/-Si, -Si/-Si/+Si, -Si/+Si/-Si, -Si/+Si/+Si, +Si/-Si/-Si, +Si/-Si/+Si, +Si/+Si/-Si, e +Si/+Si/+Si). A Figura 1 mostra oito linhas, que representam as oito diferentes combinações experimentais (T1, T2, T3, T4, T5, T6, T7 e T8). Cada uma delas com barras verticais evidenciam os três períodos do ciclo fenológico (V, R1 e R2) do arroz nos quais houve suplementação (linhas contínuas) ou não (linhas tracejadas) com Si.

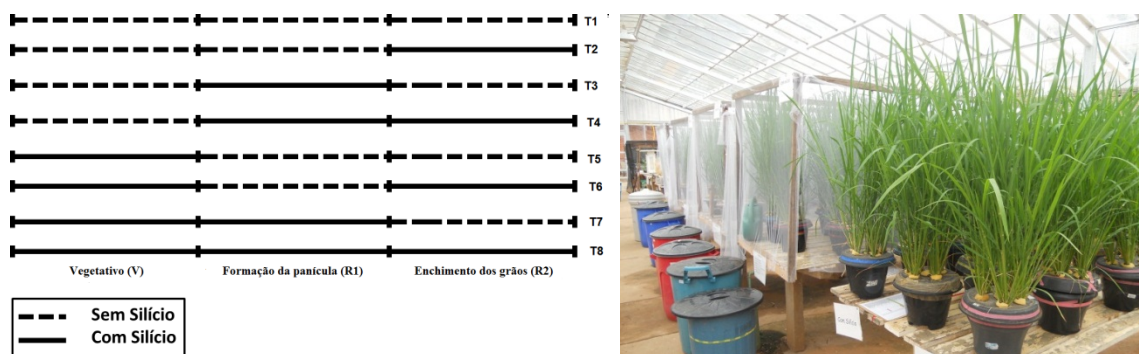


Figura 1. Esquema de suplementação (linhas contínuas) ou não (linhas tracejadas) com Si nos diferentes períodos do ciclo fenológico do arroz. Colunas separam os períodos do ciclo, e cada linha representa um tratamento, totalizando oito combinações experimentais. T1 - sem Si durante todo o ciclo (-Si-Si-Si); T2 - com Si apenas durante o enchimento dos grãos (-Si-Si+Si); T3- com Si apenas durante a formação da panícula (-Si+Si-Si); T4 - com Si a partir da formação da panícula (-Si+Si+Si); T5 - com Si apenas durante o vegetativo (+Si-Si-Si); T6 - sem Si apenas durante a formação da panícula (+Si-Si+Si); T7 - sem Si apenas durante o enchimento dos grãos (+Si+Si-Si); T8 - com Si durante todo o ciclo (+Si+Si+Si). Fig. 1B dá uma visão geral do espaço físico destinado à realização do experimento. Foto tirada em 27.10.2012.

Em todos os experimentos, foi utilizada a solução nutritiva de Hoagland & Arnon (1950) com modificações, constituída de: 1,0 mmol L⁻¹ KNO₃; 0,25 mmol L⁻¹ NH₄H₂PO₄; 0,1 mmol L⁻¹ NH₄Cl; 0,5 mmol L⁻¹ MgSO₄.7H₂O; 1,0 mmol L⁻¹ Ca(NO₃)₂; 0,30 μmol L⁻¹ CuSO₄.5H₂O; 0,33 μmol L⁻¹ ZnSO₄.7H₂O; 11,5 μmol L⁻¹ H₃BO₃; 3,5 μmol L⁻¹ MnCl₂.4H₂O; 0,1 μmol L⁻¹ (NH₄)₆Mo₇O₂₄.4H₂O; 25 μmol L⁻¹ FeSO₄.7H₂O e 25 μmol L⁻¹ EDTA bisódico.

O H₄SiO₄, obtido pela passagem do silicato de potássio (K₂SiO₄) através de uma coluna contendo resina trocadora de cátions (AMBERLITE IR-120B; H⁺ form; Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) na base (Figura 2), foi adicionado à solução nutritiva nas concentrações de 0 (-Si) ou 2 mmol Si L⁻¹ (+Si). A solução nutritiva foi completada diariamente e trocada a cada três dias, mantendo-se o pH entre 5,5 e 6,0. Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação climatizada, com temperatura ajustada para 30 (± 2)°C, sob iluminação natural (~ 80% da radiação externa à casa de vegetação), algo em torno de 1500 μmol fótons m⁻²s⁻¹.



Figura 2. Fotografia mostrando a coluna para obtenção do H_4SiO_4 .

No experimento 1, com exceção da quantificação de Si na panícula em formação, que ocorreu durante R1, aos 60 dias após o transplântio (DAT), as avaliações foram centradas no estágio R2.

Os experimentos 2 e 3 foram realizados com o intuito de esclarecer alguns mecanismos mediados por Si passíveis de alterar a condutância do mesófilo, sendo as avaliações centradas no estágio R2.

No experimento 2 foi avaliado o efeito da adição e remoção do Si nos períodos vegetativo e reprodutivo sobre a atividade da anidrase carbônica e expressão de transportadores de Si. Para tal, plantas foram cultivadas em vasos plásticos com capacidade de 5 L contendo solução nutritiva não aerada, suplementada (+Si) ou não (-Si) com H_4SiO_4 durante o período vegetativo (V – do transplântio até o início da formação da panícula). No início do período reprodutivo (formação da panícula – R1), metade das plantas em cada tratamento inicial (-Si e +Si) teve a sua suplementação com Si modificada, formando quatro combinações de tratamentos que se mantiveram até o fim do experimento (-Si-Si, -Si+Si, +Si-Si, e +Si+Si).

No experimento 3 foram avaliados os efeitos isolados e combinados da inibição de aquaporinas e do fornecimento de Si exclusivamente durante R1 nas trocas gasosas, em condições de laboratório, e alguns aspectos estruturais da folha. A inibição da abundância de aquaporinas ocorreu exclusivamente durante R1 (entre 30 e 60 DAT), sendo obtida mediante fornecimento do cloreto de mercúrio ($HgCl_2$), a cada troca de solução nutritiva, nas concentrações de 0 ($-HgCl_2$) ou 50 μM ($+HgCl_2$), nesse intervalo

de tempo, conforme Aroca et al. (2001). Posteriormente, foi realizado um estudo de coexpressão dos transportadores de Si com aquaporinas expressas durante R1, genes relacionados com fotossíntese/condutância estomática ao vapor de água e condutância do mesófilo ao CO₂.

2.2. Experimento 1

2.2.1. Quantificação de Si nos tecidos da planta

Amostras de folhas e de cascas dos grãos foram secas em estufa com circulação forçada de ar a 72°C, até biomassa constante e, em seguida, trituradas com o auxílio de esferas metálicas em um disruptor celular tipo *Mini Bead Beater 96* (Biospec Products, Bartlesville, OK, EUA), até obtenção de um pó fino, a partir do qual foi determinada colorimetricamente a concentração de Si (Korndörfer et al., 1999).

Adicionalmente, foram quantificados os níveis de Si na panícula nos estádios iniciais de sua formação (cerca de 15 dias); em função da reduzida massa das panículas, optou-se pelo método semi-quantitativo via microscopia de varredura (MEV) associada com espectrometria de energia dispersiva de raio-X (EDS). Amostras de panículas em formação foram desidratadas em série alcoólica de 30, 50, 70, 80, 95 e 100%, com intervalos de 10 min entre as trocas, realizando-se três passagens na última concentração, no mesmo intervalo de tempo. Após a desidratação, os fragmentos foram submetidos à secagem ao ponto crítico, com uso do aparelho de secagem ao ponto crítico “critical point dryer” (modelo CPD 030, Bal-Tec, Balzers, Liechtenstein), montados sobre suportes metálicos de alumínio cobertos com fita adesiva dupla-face, e evaporizadas em carbono (Quorum Q150 T). Eletromicrografias foram obtidas em microscópio eletrônico de varredura LEO (modelo 1450 VP, Carl Zeiss, Cambridge, Inglaterra), operado a 10 kV, equipado com detector de EDS, e as escalas micrométricas foram projetadas nas mesmas condições ópticas, utilizando o ródio (Rh) como padrão interno.

2.2.2. Biomassa e parâmetros agronômicos

Foram quantificados os números de folha, de perfilhos e de panículas, a área foliar, e, com o auxílio de uma régua graduada, os comprimentos da raiz e da parte aérea, de um total de 288 plantas. A área foliar foi mensurada com um medidor de área (Area Measurement System, Delta-T Devices, Cambridge, UK).

As plantas foram particionadas em raiz, colmo, folhas e grãos, e submetidas à secagem em estufa com circulação forçada de ar, a 70°C, durante 72 h; com base no valor de biomassa seca obtido para cada uma das diferentes partes, foram estimados os parâmetros agronômicos, a saber: biomassa seca de raízes, de colmos, de folhas, de grãos e a biomassa total, índice de colheita, área foliar específica (AFE), peso de mil grãos, e percentual de grãos cheios.

2.2.3. Medições de trocas gasosas foliares

A taxa fotossintética líquida (A) e a taxa de transpiração foliar (E) foram medidas simultaneamente aos parâmetros de fluorescência da clorofila a , utilizando-se um analisador de gases infravermelho (IRGA – *Infrared Gas Analyzer*), modelo LI 6400XT (LI-COR, Lincoln, NE, EUA), equipado com um fluorômetro (LI-6400-40, LI-COR Inc.), em folhas bandeira de arroz, no período de enchimento de grãos (estádio de grão leitoso). A concentração intercelular de CO_2 (C_i) e a condutância estomática ao vapor de água (g_s) foram calculadas pelo referido equipamento a partir dos valores de A e E (von Caemmerer e Farquhar, 1981). As medições foram realizadas entre 10:00 e 14:00 h, sob radiação fotossinteticamente ativa artificial (RFA) de $1000 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ em nível da folha, com 21 % de O_2 e $400 \mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ ar}$. O IRGA foi programado para realizar curvas de resposta de A à concentração interna de CO_2 (curva A/C_i), variando-se, sequencialmente, a pressão parcial de CO_2 : 40, 30, 20, 10, 5, 40, 60, 80, 100, 120, 140 e 160 Pa. Em seguida, a pressão parcial de CO_2 foi reduzida para 100 Pa, o fluxo de ar foi substituído por fluxo de nitrogênio gasoso, com 1 % O_2 para realização, nas mesmas folhas, de curvas de resposta de A à RFA em baixo O_2 .

A eficiência fotoquímica do fotossistema II (ϕ_{FSII}) foi determinada pela medição do estado estável da fluorescência (F_s) e da fluorescência máxima (F_m'), utilizando um pulso de luz saturante de aproximadamente $8000 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, seguindo procedimentos descritos por Genty et al. (1989). A taxa de transporte de elétrons (J) foi calculada como $J = \phi_{\text{FSII}} \times \beta \times \alpha \times RFA$, em que α é a absorvância da folha e β reflete

o particionamento dos pacotes de energia entre os fotossistemas I e II, e o $\alpha\beta$ foi determinado conforme Valentini et al. (1995), a partir da relação entre A e $\frac{RFA \times \Phi_{FSII}}{4}$, obtidos pela variação da intensidade de luz sob condições fotorrespiratórias. Estimativas da condutância do mesófilo (g_m) foram realizadas usando o método de Harley et al. (1992), no qual a $g_m = \frac{A}{\frac{C_i - (\Gamma^*(J + 8(A + R_d))}{J - 4(A + R_d)}}$, considerando-se valores de respiração (R_d) medidos durante a noite em $RFA = 0 \mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, e o valor conservativo do ponto de compensação para o CO_2 na ausência de R_d (Γ^*) para o arroz de 41,2 (Li et al., 2009). Para transformar as curvas A/C_i em curvas A/C_c (C_c = concentração de CO_2 nos sítios de carboxilação), C_c foi calculada de acordo com Harley (1992), em que $C_c = C_i - (A/g_m)$. A taxa máxima de carboxilação limitada pela Ribulose-1,5-bisfosfato (V_{cmax}) e a taxa máxima de carboxilação limitada pela taxa de transporte de elétrons (J_{max}), obtidas para cada curva A/C_c , foram estimadas por meio de técnicas de regressão não-linear, baseadas nas equações de Farquhar et al. (1980). Esse procedimento foi realizado utilizando o pacote de programa Solver no Microsoft Excel® (Sharkey et al., 2007). A taxa de fotorrespiração foi estimada pela fórmula $FR = \frac{1}{12}(J - (4(A + R_d)))$. As correções dos vazamentos de CO_2 e vapor de água dentro e fora da câmara do LI-6400-40 foram aplicadas para todos os dados de trocas gasosas, conforme descrito por Rodeghiero et al. (2007).

Adicionalmente, foram calculadas as limitações da fotossíntese devido a aspectos estomáticos (LE), mesofílicos (LM), e bioquímicos (LB), de acordo com Grassi e Magnani (2005):

$$LE = \frac{g_{tot} \times k}{g_{sCO_2} (g_{tot} + k)}$$

$$LM = \frac{g_{tot} \times k}{g_m (g_{tot} + k)}$$

$$LB = \frac{g_{tot}}{g_{tot} + k}$$

Sendo g_{sCO_2} a condutância estomática ao CO_2 , g_{tot} o somatório das condutâncias ao CO_2 , determinado como: $g_{tot} = \frac{g_{tot}}{(1 + g_{sCO_2}) + (1 + g_m)}$, e k a primeira derivativa de A em relação a C_c : $k = V_{cmax} \times (\Gamma^* + K_m) \times (C_c + K_m)$, sendo K_m a constante de Michaelis-Menten para o CO_2 , que considera a inibição competitiva em relação ao O_2 .

2.2.4. Invertase

A determinação das atividades enzimáticas das invertases ácida e alcalina em grãos coletados ao meio-dia na fase de enchimento (estádio grão leitoso) foi realizada conforme Zrener et al. (1995), a partir de extratos enzimáticos preparados conforme Gibon et al. (2004).

2.2.5. Amido e açúcares solúveis em grãos

Após remoção da casca de grãos maduros, os endospermas destes foram triturados com o auxílio de esferas metálicas em um disruptor celular tipo *Mini Bead Beater* 96 (Biospec Products, Bartlesville, OK, EUA); cerca de 25 mg do pó fino foi submetido à extração etanólica. Na fração insolúvel do extrato etanólico resultante foi analisado o amido, enzimaticamente, segundo Trethewey et al. (1998). Na fração solúvel, em etanol, foram determinados os teores de glicose, de frutose e de sacarose (Stitt et al., 1989).

2.2.6. Caracterização morfométrica dos grãos

Após pesagem da biomassa seca, um grupo de 100 grãos de cada tratamento foi submetido à caracterização morfométrica, mensurando-se as dimensões dos grãos (comprimento, largura e espessura) com auxílio de um paquímetro digital. Posteriormente, o material seminal foi embebido *overnight* em amolecedor etilenodiamina (10%, m/v) e cortado longitudinalmente com navalha. Fotografias foram obtidas a partir de uma câmara fotográfica acoplada a uma lupa, utilizando-se o programa *ImageJ* para calcular a relação entre as áreas do endosperma e do embrião.

2.3. Experimento 2

2.3.1. Anidrase carbônica (E.C. 4.2.1.1)

A determinação da atividade enzimática da anidrase carbônica foi realizada em folhas-bandeira, conforme Wilburn e Anderson (1948).

2.3.2. Padrão de expressão dos genes que codificam para aquaporinas/transportadores de Si

Inicialmente, procedeu-se à extração do RNA total com o reagente Trizol, seguindo recomendações do fabricante. A integridade do RNA obtido foi avaliada submetendo-o à eletroforese em gel de agarose 1% (*m/v*) em condições desnaturantes, enquanto a quantidade de RNA destinada à síntese do cDNA foi definida via espectrofotometria. A síntese de cDNA foi realizada com 1 µg do RNA total, pré-tratado com 10 µL de DNase (50 U µL⁻¹, *Amplification Grade DNase I*, Invitrogen), incubada a 37°C, por 15 min, a fim de remover possíveis contaminantes por DNA genômico. A síntese da primeira fita de cDNA foi feita em termociclador, utilizando o kit *SuperScript™ III* para qRT-PCR.

Para a análise de expressão gênica das aquaporinas/transportadores de silício foi utilizada a técnica de PCR em tempo real (*Step One Plus™ Real Time PCR System*, Applied Biosystem, California, EUA), com sistema de detecção de fluorescência SYBR green (Applied Biosystem®, California, EUA), utilizando-se um volume de reação de 20 µL por poço, contendo 2 µL do cDNA, 0,5 mM do primer específico de cada gene, e kit *Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG* com ROX. Os valores de CT foram calculados pelo programa *Real Time PCR Miner v 2.2*, a partir dos valores de fluorescência das reações.

As especificações dos *primers* utilizados para quantificar a expressão dos genes estão descritas no quadro abaixo:

Gene	Foward	Reverse
<i>Lsi1</i>	5'-CGGTGGATGTGATCGGAACCA-3'	5' -CGTCGAACTTGTTGCTCGCCA-3'
<i>Lsi2</i>	5'-ATCTGGGACTTCATGGCCC-3'	5'-ACGTTTGATGCGAGGTTGG-3'
<i>Lsi6</i>	5'-GAGTTCGACAACGTCTAATCGC-3'	5'-AGTACACGGTACATGTATACACG-3'
Histona H3	5'-AGTTTGGTCGCTCTCGATTTTCG-3'	5' TCAACAAGTTGACCACGTCACG-3'
Ubiquitina	5'-AGAAGGAGTCCACCCTCCACC-3'	5'-GCATCCAGCACAGTAAAACACG-3'

2.3.3. Análise de coexpressão

A análise de rede de coexpressão foi realizada usando dados de microarranjo da plataforma ATTED-II (<http://atted.jp/>), de acordo com Obayashi et al. (2011). Inicialmente, procedeu-se a uma análise eletrônica de *Northern*, ferramenta disponível

no *Bio Array Resource* (BAR), no intuito de verificar o padrão de expressão do gene homólogo ao *Lsi6* em *Arabidopsis* (At1g80760). Posteriormente, foi feito um cluster hierárquico e mapa de calor dos genes relacionados com a atividade da anidrase carbônica, condutância estomática ao vapor de água, fotossíntese, aquaporinas e transportadores de Si. Adicionalmente, foi avaliada a rede de coexpressão do gene *Lsi6* usando a ferramenta *CoexViewer* do ATTED-II 5.2, conforme Obayashi et al. (2009).

2.4. Experimento 3

2.4.1. Medições de trocas gasosas foliares

Realizadas conforme já descrito em 2.2.3.

2.4.2. Microscopia de luz

Fragmentos de folhas foram excisados da planta com auxílio de lâmina de bisturi, e imediatamente fixados a vácuo em glutaraldeído 2,5 % dissolvido em tampão cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7,2) e armazenados a 4°C. A coleta foi feita às 12:00 h, em dia de céu aberto. Posteriormente, procedeu-se à desidratação desses fragmentos, em série etílica crescente, e o emblocamento em metacrilato (Historesina). O material emblocado foi seccionado transversalmente na região mediana, em micrótomo rotativo com avanço automático (modelo RM 2155, Leica Microsystems Inc., Derfield, EUA) com 5 µm de espessura, corados com azul de toluidina (pH 4,4) para metacromasia, e montados em água glicerinada. Após obtenção das imagens das secções transversais em fotomicroscópio Carl Zeiss, Axion, as análises micromorfométricas destas foram realizadas utilizando-se *softwares* específicos.

2.5. Estatística

Os experimentos 1 e 2 foram montados em delineamento inteiramente casualizado, sendo a unidade experimental composta por um vaso com capacidade de 5,0 L, contendo seis plantas. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), e em seguida, procedeu-se o agrupamento das médias dos tratamentos mediante o teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade. No experimento 1, com o

objetivo de reduzir a dimensionabilidade do conjunto de dados e intensificar variáveis que explicam a maior proporção de variância total, de modo a permitir a separação de grupos de indivíduos, foi empregada a técnica de análise multivariada em componentes principais (ACP), seguida da análise de agrupamento de acordo com o método de Tocher, baseado em distâncias Euclidianas médias. Foram incluídos na ACP apenas dados do experimento 1 cujas variáveis alteraram-se significativamente em resposta aos tratamentos aplicados. No experimento 3 foi adotado arranjo fatorial 2x2, com dois níveis de Si e de HgCl₂, e as médias foram comparadas usando-se o teste *t*. As análises foram realizadas utilizando-se o Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas (SAEG, versão 9.1).

3. RESULTADOS

Aos 120 DAT, a concentração média de Si verificada em folhas de plantas de arroz cultivadas durante todo ciclo fenológico na ausência de Si foi de 0,55% (Tabela 1). Como esperado, o fornecimento de Si acarretou em aumento na concentração de Si nos tecidos foliares. A concentração foliar de Si em plantas fertilizadas com Si exclusivamente durante o período vegetativo (V), formação da panícula (R1) e enchimento de grãos (R2) foi de, respectivamente, 0,76%, 3,15% e 1,47% (Tabela 1).

A concentração de Si na casca dos grãos, de modo geral, foi maior do que na folha (Tabela 1). Cascas de grãos oriundos de plantas não fertilizadas com Si apresentaram, em média, 1,5% de Si, sendo a maior concentração de Si na casca de grãos verificada nos tratamentos em que houve fertilização com Si durante R1, quando comparado aos demais períodos do ciclo (Tabela 1). Além disso, o teor de Si na casca foi sempre maior em tratamentos com maior percentual de grãos cheios e com maior peso de mil grãos (Tabela 1, Tabela 2). Mediante análise de Si na panícula em formação, aos 15 dias após início do R1, foram detectados, ainda que em baixos níveis, alguma quantidade de Si nessa estrutura, independentemente do fornecimento desse elemento (Tabela 1). Entretanto, houve um acúmulo de Si duas vezes maior em panículas cujas plantas foram fertilizadas com Si durante R1 (Tabela 1).

Plantas que receberam o Si durante R1, independentemente da omissão ou aplicação de Si nos demais estádios, apresentaram maior número e massa de grãos em relação aos daquelas que receberam o Si apenas em V e/ou R2, sem alteração do número de panículas, da área foliar e da biomassa total (Tabela 2). Como consequência, o índice de colheita foi maior, em média, em 61,3% nas plantas que receberam Si durante R1 em relação aos demais períodos do ciclo. Registra-se que, além de um maior índice de colheita, plantas fertilizadas com Si durante R1 apresentaram ainda maior número de grãos cheios e maior massa de mil grãos. O aumento da demanda dos drenos fez aumentar em 15% a atividade fotossintética (A) na folha bandeira (Tabela 3), muito provavelmente para sustentar a maior demanda por fotoassimilados durante o enchimento dos grãos.

O referido aumento em A foi acompanhado por aumentos de 51% na condutância estomática ao vapor de água (g_s) (Tabela 3), sendo observada uma correlação positiva entre essas duas variáveis ($r^2 = 0.79$) (Figura 3). Diferentemente da concentração de CO_2 na câmara subestomática (C_i), que foi alterada pela maior g_s , a

maior concentração de CO_2 no sítio de carboxilação do cloroplasto (C_c) não foi acompanhada por aumentos na difusão de CO_2 através da membrana plasmática das células mesofílicas foliares (g_m), com o suprimento de Si durante R1 (Tabela 3). Apesar das diferenças em g_s , a taxa transpiratória (E) de plantas cultivadas continuamente na ausência de Si, por sua vez, foi similar à verificada em plantas fertilizadas com Si durante R1, fato associado a uma menor temperatura foliar em plantas fertilizadas com Si durante R1 (Tabela 3). Registra-se, por fim, que os aumentos em A foram acompanhados por um aumento concomitante na taxa máxima de carboxilação limitada pela ribulose 1,5 bisfosfato (V_{cmax}) e na taxa máxima de carboxilação limitada pela taxa de transporte de elétrons (J_{max}). Em todo o caso, não houve variações significativas na taxa de fotorrespiração (FR) (Tabela 3). Análise refinada das limitações estomáticas (LE), mesofílicas (LM) e bioquímicas (LB) da fotossíntese, confirmaram que a LE em plantas fertilizadas com Si durante R1 foi 32% menor em relação às daquelas que não receberam Si em R1, enquanto LM não variou com a imposição dos tratamentos (Tabela 4).

Para melhor explorar as alterações fisiológicas mediadas pelo Si que culminaram no aumento do rendimento em grãos no arroz, foi realizada uma PCA com os dados de trocas gasosas e de produção, no qual os dois primeiros componentes explicaram 94% da variância total dos dados (o componente 1 explicou 87,4% da variância total, ao passo que o segundo 7%). Essa ferramenta de análise permitiu a separação dos oito tratamentos iniciais em dois grupos com base no fornecimento de Si em R1 (Figura 4), confirmando que, nesse estágio, o fornecimento de Si é crucial para melhorias na produtividade do arroz.

Mediante quantificação da atividade enzimática total da invertase em grãos, no estágio de grão leitoso, foi verificada uma diminuição significativa de 54 % na atividade da invertase ácida da parede celular quando comparada à das plantas que não receberam Si durante R1, não sendo verificada diferença significativa na atividade da invertase solúvel (Figura 5). Ao contrário, o conteúdo de sacarose aumentou consideravelmente quando o grão atingiu a sua maturidade em plantas que receberam Si durante R1, enquanto os níveis de hexoses mantiveram-se baixos. Como resultado, a relação entre hexoses e sacarose foi aumentada (Figura 6).

Em paralelo, a área do embrião em relação à do endosperma foi aumentada, em média em 35% nos embriões de plantas fertilizadas com Si durante R1 (Figura 7), um indício de que estas receberam uma maior quantidade de nutrientes dos tecidos

maternos que os circundam, a fim de sustentar o seu maior crescimento e desenvolvimento. Cabe reforçar que o maior percentual de grãos cheios não foi devido a uma maior concentração de amido (Figura 6), mas sim a um maior volume de endosperma (Figura 8). Tanto o comprimento como a largura dos grãos apresentaram valores de dimensionamento bastante conservados (9,33mm x 3,54mm), enquanto a sua espessura foi restringida em 45,6% quando o Si não foi fornecido durante R1, resultando em uma diminuição de 57,5% no volume do endosperma como um todo (Figura 8), com valores de biomassa de grãos 77,5% menores, e um aumento de 83,5% no percentual de grãos vazios.

Nos experimentos 2 e 3, realizados para avaliar mecanismos mediados por Si passíveis de alterar a g_m , verificou-se, no segundo experimento, que plantas de arroz fertilizadas com Si durante o período reprodutivo do ciclo apresentaram, aos 100 DAT, um aumento de 225% na atividade foliar da enzima anidrase carbônica (AC), quando comparadas com plantas que não receberam Si no estágio R1 (Figura 9). A maior atividade da AC foi acompanhada por um aumento de 42,8% no nível de expressão do gene *Lsi6* quando o Si foi fornecido a partir do período reprodutivo, magnitude essa inclusive superior em relação aos níveis de expressão verificados em plantas fertilizadas com Si durante todo o ciclo (Figura 10). Por sua vez, o nível de expressão do gene *Lsi1* não variou com a imposição dos tratamentos, enquanto o do gene *Lsi2* foi maior em plantas cultivadas continuamente na ausência de Si (Figura 10). Na Figura 11 está apresentada análise eletrônica de *Northern* para o padrão de expressão do gene *Lsi6* em *Arabidopsis*, evidenciando a região compreendida entre o primeiro e o segundo nó do caule como a de maior expressão do gene *Lsi6*. Em arroz, esse seria o local equivaleria ao local onde se inicia a formação da panícula. Além disso, a análise evidenciou que o *Lsi6* também é expresso em folhas (Figura 11), o que justifica a análise nesse tecido e sugere que, em panículas em formação, a atividade desse gene seria ainda maior.

Utilizando ferramentas de bioinformática, resultados de microarranjos obtidos em outras condições experimentais foram utilizados para sugerir genes-candidatos relacionados com anidrase carbônica, com aspectos difusivos da fotossíntese e com aquaporinas possivelmente coexpressos com o *Lsi6* (Figura 12 e 13). Adicionalmente, foi gerada uma listagem completa dos genes coexpressos com o *Lsi6*, e dentre eles quatro foram coexpressos com genes que codificam para AC, três com genes que codificam para transportadores de ácidos orgânicos, havendo coexpressão desse

transportador de Si com apenas um gene que codifica para aquaporinas e outro que está envolvido na ativação da RuBisCO (Figuras 13, Tabela 5).

No terceiro ensaio independente, o Si *per se*, não afetou as trocas gasosas (Tabela 6). Por sua vez, houve redução expressiva de A e g_s em plantas expostas ao $HgCl_2$ durante R1 (Tabela 6). Tais resultados foram dissociados de alteração em C_i , independentemente da fertilização com Si. Em contraste, C_c e g_m foram reduzidas, apenas quando o Si não foi adicionado na solução nutritiva. As regiões da nervura mediana e do mesofilo de plantas +Si+ $HgCl_2$ mantiveram padrão similar ao de plantas-controle, e apenas nas folhas oriundas de plantas do tratamento -Si+ $HgCl_2$ houve deposição de um composto de cor preta (possivelmente Hg^{2+}) na parede de suas células do mesofilo, em paralelo a um aumento no número de lacunas na região da nervura mediana foliar (Figura 14). Salienta-se que a espessura do mesofilo foliar se manteve inalterada, ainda que em presença do $HgCl_2$ (Figura 14).

4. DISCUSSÃO

Durante o ciclo fenológico do arroz, a maior fração de Si absorvida pela planta (cerca de 2/3) ocorreu durante a formação da panícula, corroborando informações prévias (Ma et al., 1989). Embora, até então, não exista evidência concreta sobre a essencialidade do Si em plantas, os resultados do presente trabalho evidenciaram que a panícula possui Si, mas um acúmulo adicional desse elemento, até completa formação dessa estrutura, exerce efeito crucial para o aumento da produção de grãos no arroz. O gene *Lsi6* é altamente expresso no primeiro nó, o qual conecta a folha bandeira a panícula (Yamaji e Ma, 2009). Ressalta-se, inclusive, que o Si é tão necessário durante a formação da panícula que as plantas que receberam Si a partir de R1 aumentaram ainda mais a expressão do gene *Lsi6*, possivelmente uma forma de garantir concentração de Si na panícula equivalente daquelas que o receberam desde o período vegetativo do ciclo.

No pioneiro trabalho de Ma et al. (1989), que inclusive foi utilizado como base para o delineamento do presente trabalho, o fornecimento de Si durante o estágio reprodutivo em que a panícula é formada também fez aumentar o número de grãos por panícula e o percentual de grãos cheios. No entanto, Ma et al. (1989) não verificaram variações no peso de mil grãos com a imposição dos tratamentos, mas verificaram aumento na biomassa vegetativa. É possível que a maior biomassa vegetativa tenha ajudado a aumentar o percentual de grãos cheios verificados por Ma et al. (1989) em plantas fertilizadas com Si durante o estágio de formação da panícula. No presente estudo, a biomassa seca da palhada não foi aumentada com o fornecimento de Si, e ainda assim, o percentual de grãos cheios foi aumentado em paralelo a um aumento no peso de mil grãos com o fornecimento de Si durante R1, o que permitiu evidenciar, de modo mais contundente, que o Si está envolvido primordialmente na determinação no número de grãos, que ocorre durante a formação da panícula. Esse maior número de grãos resultaria em um aumento na força do dreno que, por sua vez, estaria associado com uma maior taxa fotossintética para suportar o enchimento dos grãos, conforme verificado anteriormente por Dettman et al. (2012).

Dettman et al. (2012) avaliaram o comportamento fisiológico de plantas cultivadas com ou sem Si ao longo de todo o ciclo fenológico, verificando que o fornecimento de Si leva a um aumento na produção de grãos dissociado de alterações no crescimento vegetativo e no ângulo foliar, e para sustentar esta maior demanda por fotoassimilados, a atividade fotossintética (*A*) na folha-fonte foi estimulada, fato

fundamentalmente associado com aumentos em g_m , embora os mecanismos que governariam as alterações em g_m , nesse contexto, fossem largamente desconhecidos. Em contraste com os dados de Detmann et al. (2012), que observaram que os aumentos em A foram fundamentalmente associados com aumentos em g_m , no presente trabalho os aumentos em A foram governados por aumentos em g_s , sem afetar o componente mesofílico.

Em arroz, diversos trabalhos mostram que A e g_s são fortemente correlacionados (Ishihara e Saito, 1987; Hirasawa et al., 1988), sendo a maior produção de grãos, em algumas variedades, inclusive, atribuída a aumentos em g_s que permitiriam aumentos concomitantes em A (Xu et al., 1997; Adachi et al., 2011; Taylaran et al., 2011). Resultados similares foram obtidos por DaMatta et al. (2008), que verificaram que o aumento na força do dreno fez aumentar g_s em café. Considerando-se as condições do ambiente de cultivo do presente estudo, a elevada umidade relativa do ar promoveu um menor déficit de pressão de vapor (D_{PV}), o que justificaria a maior g_s acoplada à maior A , resultando em maior concentração de CO_2 no interior da folha (C_i) e dentro do cloroplasto (C_c). Aumentos em g_s permitiriam aumentos na taxa transpiratória (E), o que explicaria a menor temperatura foliar (T_f). A menor T_f , por sua vez, poderia conduzir a uma menor respiração (R_d) e fotorrespiração (FR), e, em última instância, exacerbar as diferenças em A (Lambers et al., 1998). No entanto, a maior g_s não foi acompanhada por maiores valores instantâneos de E , possivelmente porque houve menor T_f nas plantas fertilizadas com Si durante R1, sem afetar R_d e FR . Além disso, os maiores valores de V_{cmax} e J_{max} verificados em plantas fertilizadas com Si durante R1 confirmam um aumento na eficiência de uso de CO_2 via RuBisCO, dado a uma elevada concentração desse substrato no sítio ativo da enzima. Cabe ressaltar que a energia e a água consumidas para abertura dos estômatos só não foi traduzida em grandes aumentos em A (~ 15 %) devido a limitações em g_m .

Apesar da muito baixa correlação entre A e g_m ($r^2 = 0.13$) (Figura 3), verificou-se uma clara tendência de que grandes variações em g_m seriam passíveis de ocasionar pequenas mudanças em A , mas a g_s foi tão alta que aumentou a A , C_i e a C_c sem precisar aumentar a g_m . Flexas et al. (2012) relatam que g_s e g_m são altamente correguladas, e aumentos significativos em C_i e C_c poderiam acarretar algum decréscimo em g_m . O aumento em V_{cmax} em plantas fertilizadas com Si durante R1 poderia ser interpretado como uma menor LB em plantas fertilizadas com Si durante R1. No entanto, a contribuição da limitação difusiva ($LE + LM$) foi largamente superior em relação à

contribuição da LB em tratamentos cujas plantas foram fertilizadas com Si durante R1. Como um todo, estas informações sugerem a importância de aspectos difusivos no controle de A e ainda ajudaram a explicar a intrigante relação entre g_s e g_m no controle de A em plantas de arroz fertilizadas com Si durante R1.

Além disso, com base nos resultados do segundo e terceiro experimentos, realizados com o intuito de esclarecer alguns mecanismos mediados por Si passíveis de alterar a g_m , em função dos resultados contrastantes em relação ao de Detmann et al. (2012), ficou evidente que o Si afeta de alguma forma a atividade da AC e a abundância de aquaporinas (AQ). Flexas et al. (2012) argumentam que a contribuição da AC é maior que a da AQ quando o valor de g_m é baixo. Com base nas informações geradas pela rede de coexpressão do transportador de Si *Lsi6* foram identificados alguns genes que codificam para AC, com diferentes localizações celulares. A AC contribui com 1% para o total de proteína na folha, e as AC's que estão localizadas no cloroplasto podem contribuir para o aumento em g_m (Flexas et al., 2012). Um dos genes identificados coexpressos com o *Lsi6* codifica uma β AC que atua na regulação do movimento estomático de CO_2 nas células-guarda, existindo interação entre AC com três genes que codificam para transportadores de ácidos orgânicos nas células-guarda e um que codifica para um gene envolvido na ativação da RuBisCO. Assim, é possível que o fornecimento de Si no estágio R1, em paralelo a uma maior atividade da AC, promoveu um aumento no *pool* de hexoses-P, para influxo de ácidos orgânicos dentro das células-guarda, tornando-as mais túrgidas (Kim et al., 2010), em paralelo a uma maior atividade da RuBisCO. Detmann et al. (2013) verificaram um aumento na atividade final da RuBisCO em plantas fertilizadas com Si, mas sem verificar diferenças significativas no valor de V_{cmax} . Neste trabalho, os valores de V_{cmax} foram aumentados com o fornecimento de Si em R1, corroborando o aumento na atividade de enzima relacionada com a carboxilação. A maior turgidez, por sua vez, mediará uma maior abertura dos estômatos, o que, associado com uma maior g_s , resultou em aumentos de A , fato acoplado com maior atividade dos drenos. No que se refere às AQ, provavelmente a presença de Si reduziu a inibição das aquaporinas por Hg^{2+} , na medida em que evitou o declínio nos valores de A e g_m . Por outro lado, o estudo independente envolvendo AQ foi realizado em condição de laboratório, em período caracterizado pela ocorrência de chuvas frequentes e severas, e com isso A não variou com o fornecimento de Si e nem foram verificadas limitações difusivas e bioquímicas.

Com o maior estímulo em *A* associado a maior g_s , houve, provavelmente, uma maior exportação de fotoassimilados para o grão. Esperava-se, no início do enchimento, uma maior atividade da enzima invertase, no sentido de degradar a sacarose exportada da folha para o grão para a síntese de amido. No entanto, verificou-se uma antecipação no enchimento de grãos. Como o grão já havia sido formado, não houve consumo de hexoses para formar amido, resultando em uma paralização no consumo de hexoses, que associada à menor atividade da invertase ácida no início do enchimento, acarretou em diminuição na razão hexose/sacarose no grão completamente formado. Sugere-se, aqui, a ocorrência de retroinibição da enzima invertase, o que favoreceu um acúmulo de sacarose. Uma vez que a sacarose é um açúcar móvel, não se descarta a possibilidade de que esta tenha sido deslocada para o eixo embrionário a fim de nutrir o embrião; de fato, a relação entre as áreas ocupadas pelo embrião em relação à do endosperma foi aumentada.

Plantas de arroz cultivadas na ausência de Si completaram o seu ciclo de vida, mas apresentaram uma drástica redução no rendimento de grãos. Análises de Si na panícula em formação sugerem que o Si faz parte dessa estrutura reprodutiva e/ou, poderia estar diretamente associado com o aumento da fertilidade, aumentando o número de grãos mediante processos de sinalização ainda não esclarecidos; assim, o fornecimento de Si até a emissão da panícula parece crucial para a fertilidade. Além disso, panículas de plantas que receberam Si exclusivamente durante R1 apresentaram níveis de Si similares aos de plantas que o receberam durante todo o ciclo, e aumentaram ainda mais a expressão do transportador de Si *Lsi6*. Num futuro próximo, análises de transcriptoma serão realizadas na panícula ainda em formação numa tentativa de identificarem-se genes-candidatos potencialmente regulados em nível genômico global pelo Si. Com a caracterização e quantificação da expressão desses genes-candidatos, será possível avançar na compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos no aumento da produtividade do arroz mediado pelo Si.

REFERÊNCIAS

- Adachi, S.; Tsuru, Y.; Nito, N.; Murata, K.; Yamamoto, T.; Ebitani, T.; Ookawa, T.; Hirasawa, T. Identification and characterization of genomic regions on chromosomes 4 and 8 that control the rate of photosynthesis in rice leaves. **Journal of Experimental Botany** **62**: 1927 - 1938, 2011.
- Aroca, R.; Tognoni, F.; Irigoien, J. J.; Sanchés-Días, M.; Pardossi, A. Different root low temperature response of two maize genotypes differing in chilling sensitivity. **Plant Physiology and Biochemistry** **39**: 1067 - 1073, 2001.
- Balakhnina, T.; Borkowska, A. Effects of silicon on plant resistance to environmental stresses: review. **International Agrophysics** **27**: 225 - 232, 2013.
- Costa, L. M.; Yuan, J.; Rouster, J.; Paul, W.; Dickinson, H.; Gutierrez-Marcos, J. F. Maternal control of nutrient allocation in plant seeds by genomic imprinting. **Current Biology** **22**: 160 - 165, 2012.
- DaMatta, F. M.; Cunha, R. L.; Antunes, W. C.; Martins, S. V.; Araújo, W. L.; Fernie, A.; Moraes, G. A. B. K. In field-grown coffee trees source-sink manipulation alters photosynthetic rates, independently of carbon metabolism, via alterations in stomatal function. **New Phytologist** **178**: 348 - 357, 2008.
- Detmann, K. C.; Araújo, W. L.; Martins, S. C.; Sanglard, L. M.; Reis, J. V.; Detmann, E.; Rodrigues, F. Á.; Nunes-Nesi, A.; Fernie, A. R.; DaMatta, F. M. Silicon nutrition increases grain yield, which, in turn, exerts a feed-forward stimulation of photosynthetic rates via enhanced mesophyll conductance and alters primary metabolism in rice. **New Phytologist** **196**: 752 - 762, 2012.
- Detmann, K. C.; Araújo, W. L.; Martins, S. V. C.; Fernie, A. R.; DaMatta, F. M. Metabolic alterations triggered by silicon nutrition: Is there a signaling role for silicon? **Plant Signaling & Behavior** **8**: e22523, 2013.
- Epstein E. Silicon: its manifold roles in plants. **Annals of Applied Biology** **155**: 155 - 160, 2009.
- Epstein, E. Silicon. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology** **50**: 641 - 664, 1999.
- Farquhar, G. D.; von Caemmerer, S.; Berry, J. A. A biochemical model of photosynthetic CO₂ assimilation in leaves of C₃ species. **Planta** **149**: 78 - 90, 1980.
- Fauteux, F.; Chain, F.; Belzille, F.; Menzies, J. G.; Belanger, R. R. The protective role of silicon in the *Arabidopsis* powdery mildew pathosystem. **Proceedings of the**

National Academy of Sciences of the United States of America 103: 17554 - 17559, 2006.

Flexas, J.; Barbour, M. M.; Brendel, O.; Cabrera, H. M.; Carriquí, M.; Díaz-Espejo, A.; Douthe, C.; Dreyer, E.; Ferrio, J. P.; Gago, J.; Gallé, A.; Galmés, J.; Kodama, N.; Medrano, H.; Niinemets, U.; Peguero-Pina, J. J.; Pou, A.; Ribas-Carbo, M.; Tomás, M.; Tosens, T.; Warren, C. R. Mesophyll diffusion conductance to CO₂: An unappreciated central player in photosynthesis. **Plant Science 193:** 70 – 84, 2012.

Fujita, M.; Horiuchi, M.; Ueda, Y.; Mizuta, Y.; Kubo, T.; Yano, K.; Yamaki, S.; Tsuda, K.; Nagata, T.; Niihama, M.; Kato, H.; Kikuchi, S.; Hamada, K.; Mochizuki, T.; Ishimizu, T.; Iwai, H.; Tsutsumi, N.; Kurata, N. Rice Expression Atlas In Reproductive Development. **Plant and Cell Physiology 51:** 2060 - 2081, 2010.

Gibon, Y.; Blaesing, O. E.; Hannemann, J.; Carillo, P.; Höhne, M.; Hendriks, J. H. M.; Palacios, N.; Cross, J.; Selbig, J.; Stitt, M. A Robot-based platform to measure multiple enzyme activities in Arabidopsis using a set of cycling assays: Comparison of changes of enzyme activities and transcript levels during diurnal cycles and in prolonged darkness. **Plant Cell 16:** 3304 - 3325, 2004.

Grassi, G.; Magnani, F. Stomatal, mesophyll conductance and biochemical limitations to photosynthesis as affected by drought and leaf ontogeny in ash and oak trees. **Plant, Cell and Environment 28:** 834 - 849, 2005.

Harley, P. C.; Loreto, F.; Di Marco, G.; Sharkey, T. D. Theoretical considerations when estimating mesophyll conductance to CO₂ flux by analysis of the response of photosynthesis to CO₂. **Plant Physiology 98:** 1429 - 1436, 1992.

Hirasawa, T.; Iida, Y.; Ishihara, K. Effect of leaf water potential and air humidity on photosynthetic rate and diffusive conductance in rice plants. **Japanese Journal of Crop Science 57:** 112 - 118, 1988.

Horie, T.; Lubis, I.; Takai, T.; Ohsumi, A.; Kuwasaki, K.; Katsura, K.; Nii, A. Physiological traits associated with high yield potential in rice. In: Mew, T. W.; Brar, D. S.; Peng, S.; Dawe, D.; Hardy, B. **Rice science: innovations and impact for livelihood.** Los Baños, The Philippines: IRRI. 2003. p. 117 - 145.

Ishihara, K.; Saito, K. Diurnal courses of photosynthesis, transpiration, and diffusive conductance in the single-leaf of the rice plants grown in the paddy field under submerged condition. **Japanese Journal of Crop Science 56:** 8 - 17, 1987.

Keeping, M. G.; Reynolds, O. L. Silicon in agriculture: new insights, new significance and growing application. **Annals of Applied Biology 155:** 153 - 154, 2009.

Kim, T-H.; Böhmer, M.; Hu, H.; Nishimura, N.; Schroeder, J. I. Guard cell signal transduction network: advances in understanding abscisic acid, CO₂, and Ca²⁺ signaling. **Annual Review of Plant Biology** **61**: 561 - 591, 2010.

Korndörfer, G. H.; Coelho, N. M.; Snyder, G. H.; Mizutani, C. T. Avaliação de métodos de extração de silício para solos cultivados com arroz de sequeiro. **Revista Brasileira de Ciência do Solo** **23**: 101 - 106, 1999.

Lambers, H.; Chapin, F. S.; Pons, T. L. **Plant physiological ecology**. New York: Springer, 1998.

Ma, J. F.; Nishimura, K.; Takahashi, E. Effect of silicon on the growth of rice plant at different growth stages. **Soil Science and Plant Nutrition** **35**: 347 - 356, 1989.

Ma, J. F.; Takashashi, E. **Soil, Fertilizer, and Plant Silicon Research in Japan**. Elsevier science, Amsterdam, 2002.

Ma, J. F.; Tamai, K.; Yamaji, N.; Mitani, N. Transport of silicon from roots to panicles in plants. **Proceeding of Japan Academy** **87**: 377 - 385, 2011.

Ma, J. F.; Tamai, K.; Yamaji, N.; Mitani, N.; Konishi, S.; Katsuhara, M.; Ishiguro, M.; Murata, Y.; Yano, M. A silicon transporter in rice. **Nature** **440**: 688 - 691, 2006.

Ma, J. F.; Yamaji, N. Silicon uptake and accumulation in higher plants. **Trends in Plant Science** **11**: 1 - 6, 2006.

Rodeghiero, M.; Niinemets, U.; Cescatti, A. Major diffusionleaks of clamp-on leaf cuvettes still unaccounted: how erroneous are the estimates of Farquhar et al. model parameters? **Plant, Cell and Environment** **30**: 1006 - 1022, 2007.

Sakurai, J.; Ishikawa, F.; Yamaguchi, T.; Uemura, M.; Maeshima, M. Identification of 33 rice aquaporin genes and analysis of their expression and function. **Plant and Cell Physiology** **46**: 1568 - 1577, 2005.

Sharkey, T. D.; Bernacchi, C. J.; Farquhar, G. D.; Singsaas, E. L. Fitting photosynthetic carbon dioxide response curves for C₃ leaves. **Plant, Cell and Environment** **30**: 1035 - 1040, 2007.

Stitt, M.; Lilley, R. M. C.; Gerhardt, R.; Heldt, H.W. Metabolite levels in specific cells and subcellular compartments of plant leaves. **Methods in Enzymology** **174**: 518 - 552, 1989.

Taylaran, R. D.; Adachi, S.; Ookawa, T.; Hirasawa, U. Hydraulic conductance as well as nitrogen accumulation plays a role in the higher rate of leaf photosynthesis of the most productive variety of rice in Japan. **Journal of Experimental Botany** **62**: 4067 - 4077, 2011.

Terashima, I.; Hanba, Y. T.; Tholen, D.; Niinemets, U. Leaf Functional Anatomy in Relation to Photosynthesis. **Plant Physiology** **155**: 108 - 116, 2011.

Tholen, D.; Zhu, X. G. The mechanistic basis of internal conductance: a theoretical analysis of mesophyll cell photosynthesis and CO₂ diffusion. **Plant Physiology** **156**: 90 - 105, 2011.

Trethewey, R. N.; Geigenberger, P.; Riedel, K.; Hajirezaei, M. R.; Sonnewald, U.; Stitt, M.; Riesmeier, J. W.; Willmitzer, L. Combined expression of glucokinase and invertase in potato tubers leads to a dramatic reduction in starch accumulation and a stimulation of glycolysis. **Plant Journal** **15**: 109 - 118, 1998.

Valentini, R.; Epron, D.; Angelis, P.; Matteucci, G.; Dreyer, E. *In situ* estimation of net CO₂ assimilation, photosynthetic electron flow and photorespiration in Turkey oak (*Q. cerris* L.) leaves: diurnal cycles under different levels of water supply. **Plant, Cell and Environment** **18**: 631–640, 1995.

Wilbur, K. M.; Anderson, N. G. Electrometric and colorimetric determination of carbonic anhydrase. **Journal of Biological Chemistry** **176**: 147 - 154, 1948.

Xu, Z.; Zhou, G. Responses of leaf stomatal density to water status and its relationship with photosynthesis in a grass. **Journal of Experimental Botany** **59**: 3317 - 3325, 2008.

Yamaji, N.; Ma, J. F. Silicon transporter *Lsi6* at the node is responsible for inter-vascular transfer of silicon in rice. **Plant Cell** **21**: 2878 - 2883, 2009.

Yamaji, N.; Mitatni, N.; Ma, J. F. A transporter regulating silicon distribution in rice shoots. **Plant Cell** **20**: 1381 - 1389, 2008.

Yukutake, Y.; Tsuji, S.; Hirano, Y.; Adachi, T.; Takahashi, T.; Fujihara, K.; Agre, S.; Yasui, M.; Suematsu, M. Mercury chloride decreases the water permeability of aquaporin-4-reconstituted proteoliposomes. **Biology Cell** **100**: 355 - 363, 2008.

Zrenner, R.; Salanoubat, M.; Willmitzer, L.; Sonnewald, U. Evidence for the crucial role of sucrose synthase for sink strength using transgenic potato plants (*Solanum tuberosum* L.). **Plant Journal** **7**: 97 - 107, 1995.

Tabela 1. Efeito da fertilização com Si (0 ou 2 mM, respectivamente, -Si e +Si) nos períodos vegetativo (V), formação da panícula (R1) e enchimento de grãos (R2) na concentração de Si (%) em tecidos de arroz cv. ‘Oochikara’. Com exceção da concentração de Si na panícula, que foi determinada aos 60 DAT, teores foram determinados a partir de amostras vegetais coletadas aos 120 após transplântio (n = 6).

V	-Si				+Si			
	-Si		+Si		-Si		+Si	
	-Si	+Si	-Si	+Si	-Si	+Si	-Si	+Si
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
R1								
R2								
Si na folha (%)	0,55 D	1,47 C	3,15 B	4,15 A	0,76 D	1,34 C	3,34 B	3,60 B
Si na casca do grão (%)	1,50B	1,02 B	3,85 A	4,56 A	2,86 B	3,06 B	3,97 A	4,35 A
Si na panícula em formação (%)	0,53 B	0,53 B	1,00 A	1,00 A	0,69 B	0,69 B	1,21 A	1,21 A

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Tabela 2. Efeito da fertilização com Si (0 ou 2 mM, respectivamente, -Si e +Si) nos períodos vegetativo (V), formação da panícula (R1) e enchimento de grãos (R2) nos parâmetros de produção em arroz cv. ‘Oochikara’, aos 120 após transplântio (n = 6).

V	-Si				+Si			
	-Si		+Si		-Si		+Si	
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
R1								
R2								
Altura (cm)	119 A	120 A	120 A	122 A	124 A	123 A	125 A	125 A
AFE (m ² kg ⁻¹)	15,8 A	15,4 A	17,7 A	18,4 A	17,1 A	17,3 A	18,1 A	17,8 A
AF (m ²)	0,12 A	0,12 A	0,12 A	0,12 A	0,12 A	0,12 A	0,12 A	0,12 A
Nº folhas	40,5 A	40,1 A	42,3 A	41,8 A	41,2 A	40,9 A	41,9 A	42,3 A
Nº perfilhos	7,81 A	7,89 A	8,08 A	7,86 A	7,89 A	7,92 A	8,03 A	7,97 A
Nº panículas	7,11 A	7,03 A	6,97 A	7,08 A	7,13 A	7,17 A	7,00 A	7,11 A
Nº grãos. planta ⁻¹	304 B	289 B	440 A	429 A	287 B	302 B	436 A	445 A
Nº grãos. panícula ⁻¹	43,9 B	42,4 B	63,6 A	62,8 A	41,4 B	43,2 B	63,4 A	64,1 A
Biomassa raiz (g)	2,79 A	2,70 A	2,22 B	2,31 B	2,77 A	3,05 A	2,22 B	2,09 B
Biomassa colmo (g)	20,3 A	19,8 A	20,0 A	19,1 A	20,3 A	20,1 A	19,3 A	18,9 A
Biomassa folhas (g)	7,74 A	8,08 A	7,08 A	6,75 A	7,41 A	7,25 A	6,91 A	6,91 A
Biomassa grãos (g)	7,79 B	7,69 B	14,3 A	14,0 A	8,50 B	8,08 B	14,0 A	14,6 A
Biomassa total (g)	37,9 A	37,3 A	42,6 A	41,2 A	37,9 A	37,5 A	41,4 A	41,5 A
Índice de colheita (g. g ⁻¹)	0,21 B	0,21 B	0,34 A	0,35 A	0,22 B	0,22 B	0,35 A	0,35 A
Peso 1000 grãos (g)	25,7 B	26,3 B	32,5 A	32,5 A	29,5 B	26,8 B	32,3 A	32,9 A
Grãos cheios (%)	63,5 B	66,2 B	83,3 A	83,2 A	75,7 B	70,2 B	82,9 A	82,8 A

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade ($N = 288$).

Tabela 3. Efeito da fertilização com Si (0 ou 2 mM, respectivamente, -Si e +Si) nos períodos vegetativo (V), formação da panícula (R1) e enchimento de grãos (R2) nos parâmetros de trocas gasosas obtidos *in situ* [taxa fotossintética (A), condutância estomática (g_s), concentração interna de CO_2 (C_i), taxa transpiratória (E) e respiração no escuro (R_d)] e derivados de curvas $A-C_c$ [concentração de CO_2 no cloroplasto (C_c), condutância do mesofilo (g_m), taxa fotorespiratória (FR), taxa máxima de carboxilação limitada pela Ribulose 1,5 bisfosfato ($V_{c,max}$), e taxa máxima de carboxilação limitada pela taxa de transporte de elétrons (J_{max})] em arroz cv. ‘Oochikara’, aos 100 dias após transplantio. Todos os dados foram obtidos de folhas bandeira ($n = 6$).

V	-Si				+Si			
R1	-Si		+Si		-Si		+Si	
R2	-Si	+Si	-Si	+Si	-Si	+Si	-Si	+Si
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
A ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	22,94 B	23,28 B	25,92 A	26,76 A	21,79 B	22,65 B	25,85 A	25,81 A
g_s ($\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	0,410 B	0,428 B	0,620 A	0,657 A	0,405 B	0,407 B	0,599 A	0,612 A
g_s ($\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	0,234 B	0,226 B	0,414 A	0,431 A	0,249 B	0,243 B	0,374 A	0,382 A
C_i ($\mu\text{mol mol}^{-1}$)	275,1 B	288,2 B	300,3 A	300,5 A	283,2 B	274,3 B	298,6 A	299,8 A
E ($\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	5,70 A	4,94 A	5,52 A	5,53 A	5,21 A	5,87 A	5,51 A	5,88 A
T_f ($^{\circ}\text{C}$)	29,87 A	29,44 A	27,80 B	27,59 B	29,03 A	30,12 A	28,59 B	28,68 B
g_m ($\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	0,250 A	0,219 A	0,284 A	0,221 A	0,214 A	0,223 A	0,258 A	0,207 A
C_c ($\mu\text{mol mol}^{-1}$)	164,4 B	153,6 B	196,7 A	180,9 A	169,5 B	160,2 B	191,6 A	171,6 A
FR ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	8,37 A	7,74 A	7,60 A	7,99 A	7,39 A	8,33 A	7,87 A	9,22 A
$V_{c,max}$ ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	90,84 B	89,04 B	99,69 A	99,75 A	86,26 B	89,95 B	97,35 A	97,34 A
J_{max} ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	113,7 B	119,8 B	130,7 A	122,5 A	108,8 B	110,1 B	127,3 A	119,1 B

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Tabela 4. Efeito da fertilização com Si (0 ou 2 mM, respectivamente, -Si e +Si) nos períodos vegetativo (V), formação da panícula (R1) e enchimento de grãos (R2) nas limitações fotossintéticas [limitação estomática (LE), limitação mesofílica (LM) e limitação bioquímica (LB)] em arroz cv. ‘Oochikara’, aos 100 dias após transplântio. Adicionalmente, estão apresentados dados de temperatura foliar (T_f). Todos os dados foram obtidos de folhas bandeira (n = 6).

V	-Si				+Si			
	-Si		+Si		-Si		+Si	
	-Si	+Si	-Si	+Si	-Si	+Si	-Si	+Si
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
R1								
R2								
Limitação estomática	0,273 A	0,265 A	0,177 B	0,168 B	0,245 A	0,275 A	0,190 B	0,183 B
Limitação mesofílica	0,297 A	0,311 A	0,265 A	0,322 A	0,290 A	0,302 A	0,283 A	0,340 A
Limitação bioquímica	0,430 B	0,424 B	0,558 A	0,510 B	0,464 B	0,423 B	0,527 A	0,477 B

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

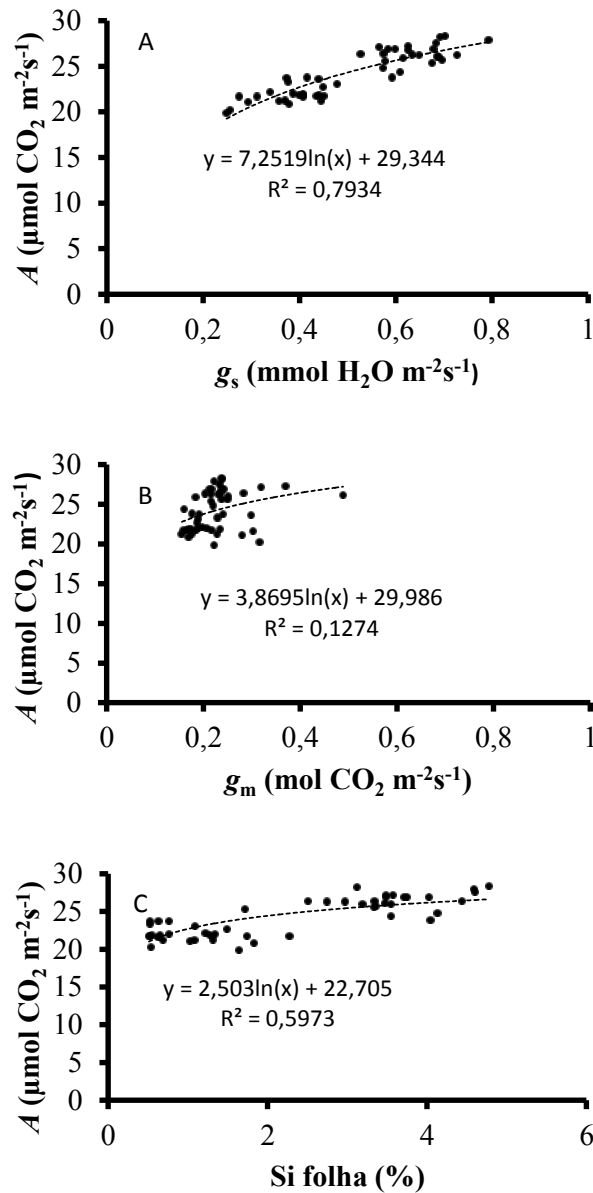


Figura 3. Gráficos de correlação de Pearson, evidenciando a associação entre a taxa fotossintética (A) e a condutância estomática ao vapor de água (g_s) (A), A com a condutância do mesofilo ao dióxido de carbono (g_m) (B); A com a concentração de Si na folha (C).

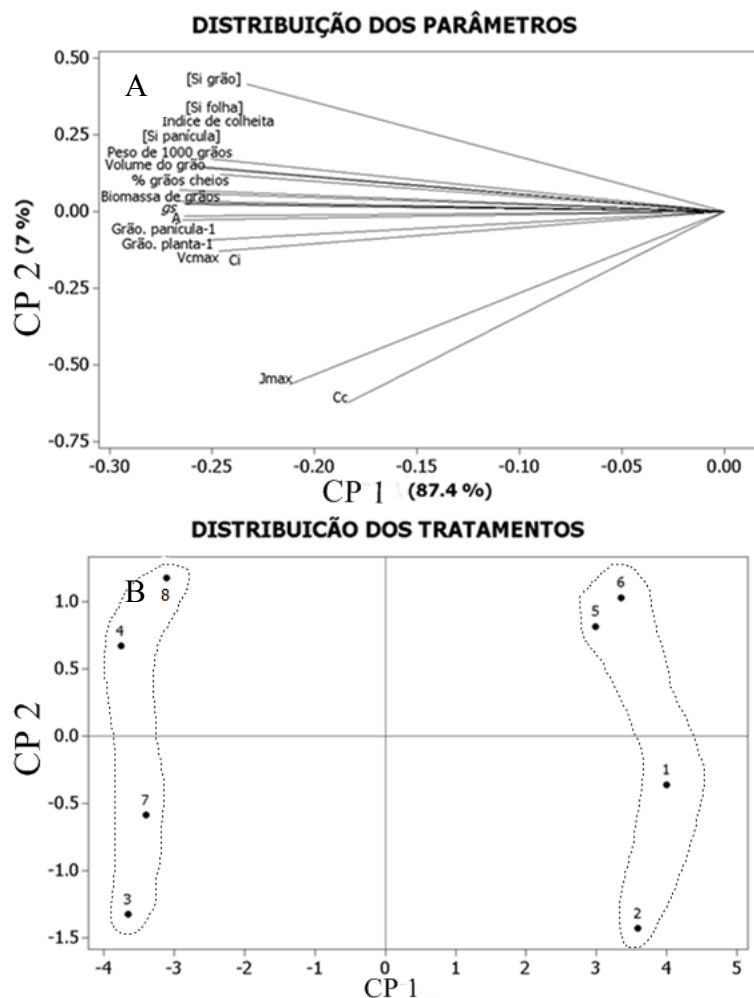


Figura 4. Coeficientes de ponderação associados às variáveis: concentração de Si no grão ([Si grão]), concentração de Si na folha taxa ([Si folha]), concentração de si na panícula ([Si panícula]), índice de colheita, peso de 1000 grãos, volume de grãos, % de grãos cheios, biomassa de grãos, número de grãos por planta, número de grãos por panícula, taxa fotossintética (A), condutância estomática ao vapor de água (g_s), concentração interna de CO_2 (C_i), concentração de CO_2 no cloroplasto (C_c), taxa máxima de carboxilação limitada pela Ribulose-1,5-bisfosfato (V_{cmax}), e taxa máxima de carboxilação limitada pela taxa de transporte de elétrons (J_{max}] (A). Grupos formados com base nos *scores* relativos aos oito tratamentos formados no final do experimento (1: -Si/-Si/-Si, 2: -Si/-Si/+Si, 3: -Si/+Si/-Si, 4: -Si/+Si/+Si, 5: +Si/-Si/-Si, 6: +Si/-Si/+Si, 7: +Si/+Si/-Si, e 8: +Si/+Si/+Si) em relação aos dois componentes principais (CP 1 e CP2) (B).

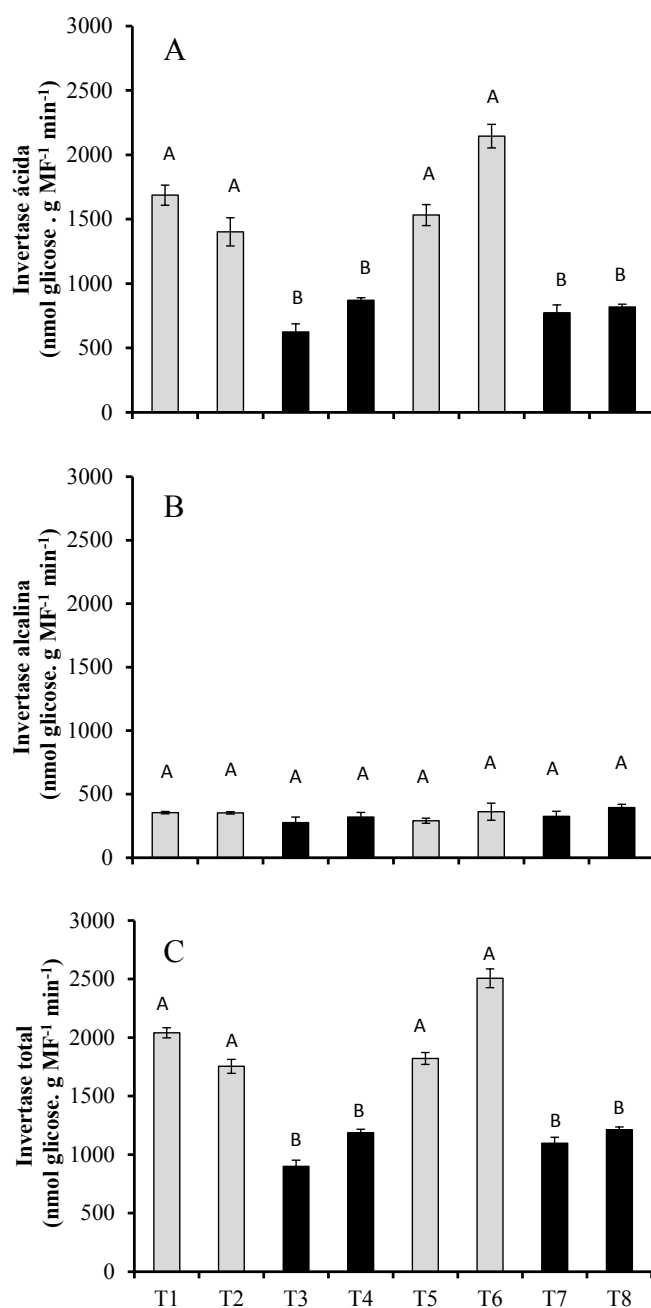


Figura 5. Atividade da invertase ácida (A), alcalina (B), e total (C) ($n = 6$) em grãos de arroz, em fase de enchimento (grão leitoso). Estão contrastados, em escala de cinza, tratamentos suplementados (escuro) ou não (claro) com Si no início do período reprodutivo (R1). Tratamentos: T1: -Si/-Si/-Si, T2: -Si/-Si/+Si, T3: -Si/+Si/-Si, T4: -Si/+Si/+Si, T5: +Si/-Si/-Si, T6: +Si/-Si/+Si, T7: +Si/+Si/-Si, e T8: +Si/+Si/+Si. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5 % de probabilidade ($n = 6 \pm EP$).

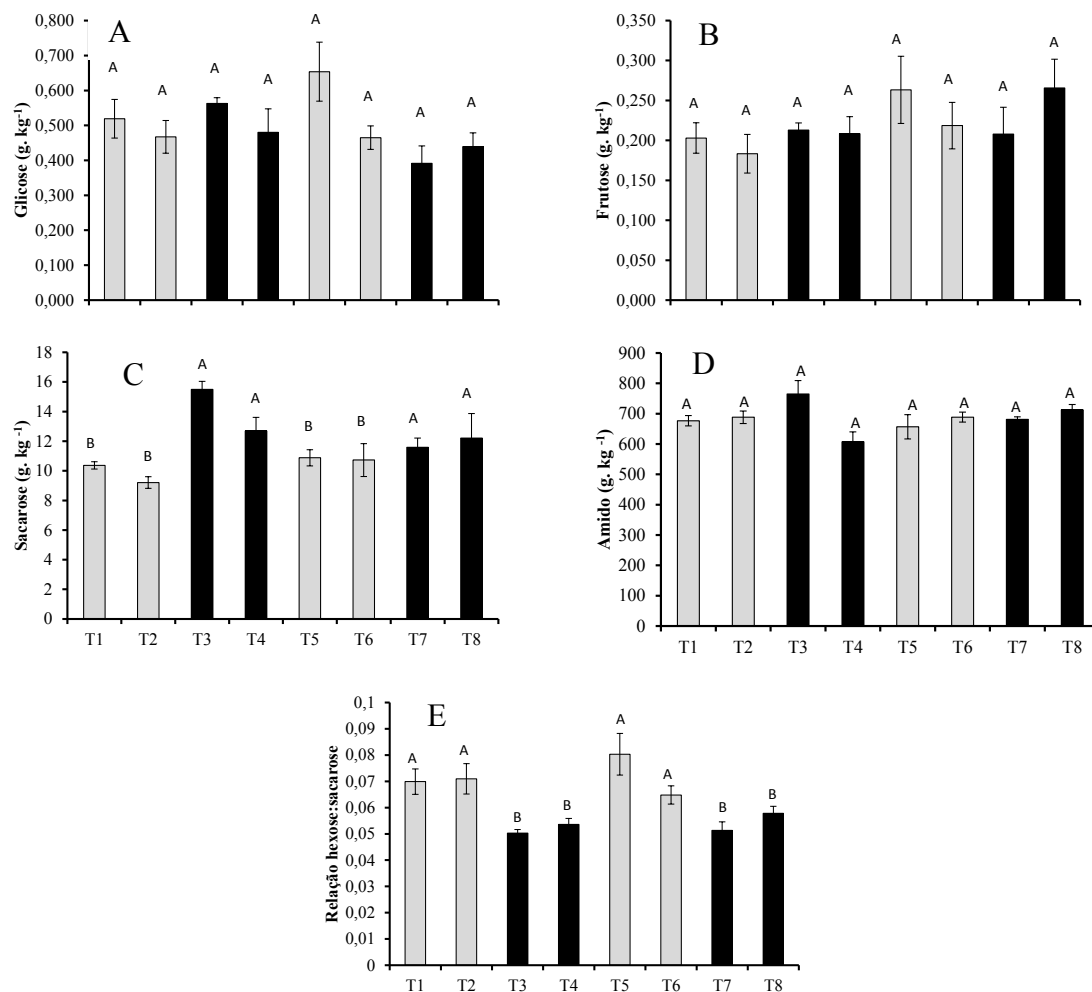


Figura 6. Concentração de glicose (A), frutose (B), sacarose (C), e amido (D) e reação entre hexose:sacarose (E) em grãos maduros de arroz sem casca, nos respectivos tratamentos, aos 120 dias após o transplântio. Estão contrastados, em escala de cinza, tratamentos suplementados (escuro) ou não (claro) com Si no início do período reprodutivo (R1). Para a descrição dos tratamentos, vide a legenda da Figura 5. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5 % de probabilidade ($n = 6 \pm EP$).

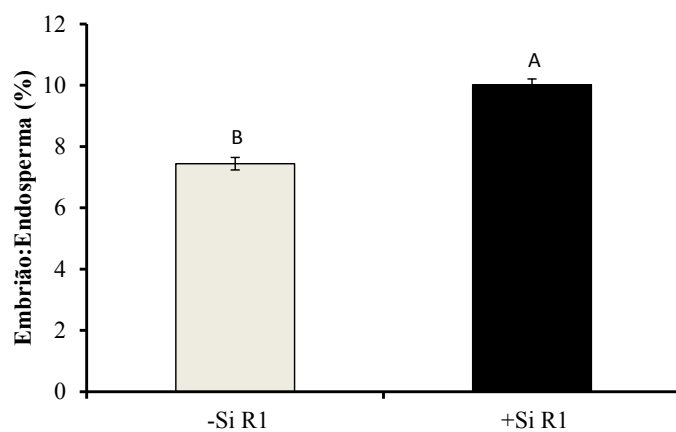


Figura 7. Área do embrião em relação à do endosperma em grãos maduros de arroz. Estão contrastados, em escala de cinza, tratamentos suplementados (escuro) ou não (claro) com Si no período início do reprodutivo (R1). Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5 % de probabilidade ($N = 100 \pm EP$).

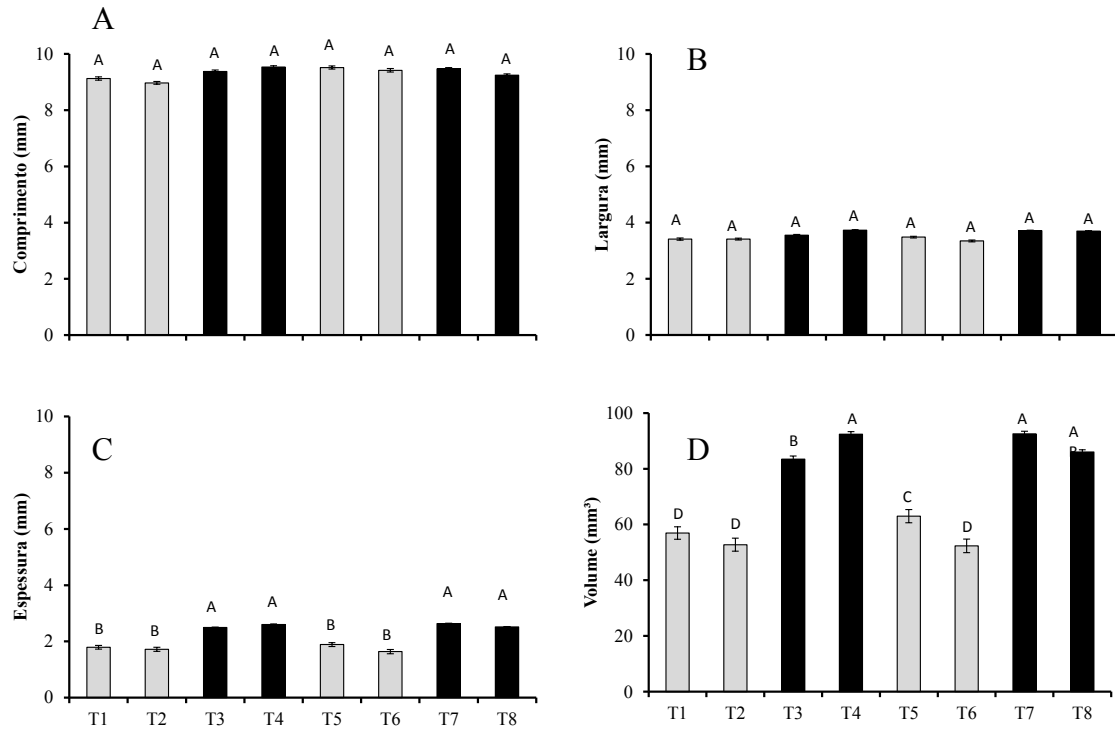


Figura 8. Comprimento (A), largura (B), espessura (C), volume (D) dos grãos (N = 100), aos 120 dias após o transplante (DAT). Estão contrastados, em escala de cinza, tratamentos suplementados (escuro) ou não (claro) com Si no período início do reprodutivo (R1). Para a descrição dos tratamentos, vide a legenda da Figura 5. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5 % de probabilidade ($n = 6 \pm EP$).

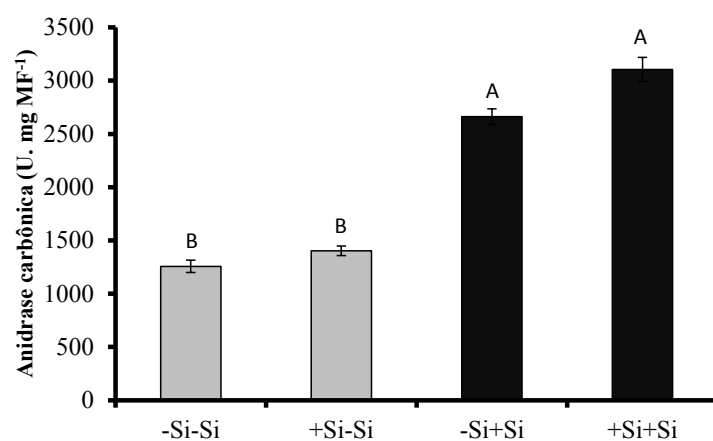


Figura 9. Efeito da fertilização com Si (0 ou 2 mM, respectivamente, -Si e +Si) na atividade da anidrase carbônica em folhas bandeira de arroz cv. ‘Oochikara’, aos 100 dias após transplântio. Estão contrastados em escala de cinza tratamentos suplementados (escuro) ou não (claro) com Si no período reprodutivo. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5 % de probabilidade ($n = 6 \pm EP$).

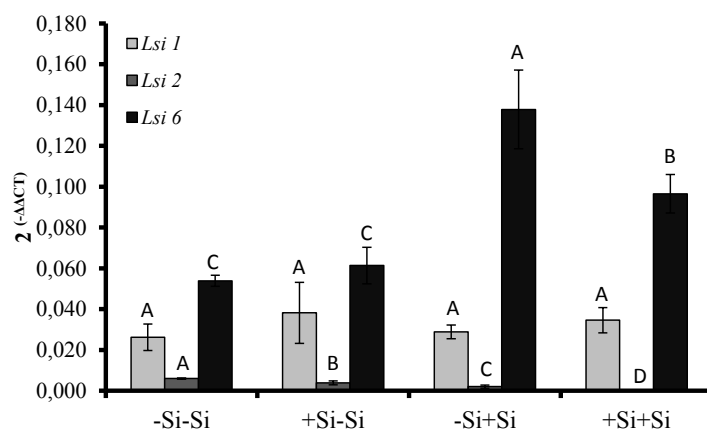


Figura 10. Análise de RT-qPCR do padrão de expressão de genes que codificam para aquaporina (*Lsi1*) e transportadores de Si (*Lsi2* e *Lsi6*) em folhas-bandeira de arroz cv. ‘Oochikara’, aos 100 dias após transplântio. Dois genes foram utilizados como padrão de referência da expressão (histona H3 e ubiquitina). Dados dos genes que codificam para aquaporinas ou transportador de Si são mostrados como diferença de vezes no aumento da expressão dos genes avaliados em relação aos genes de referencia ($2^{(-\Delta\Delta CT)}$). Para cada gene, médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5 % de probabilidade (n =6 ±EP).

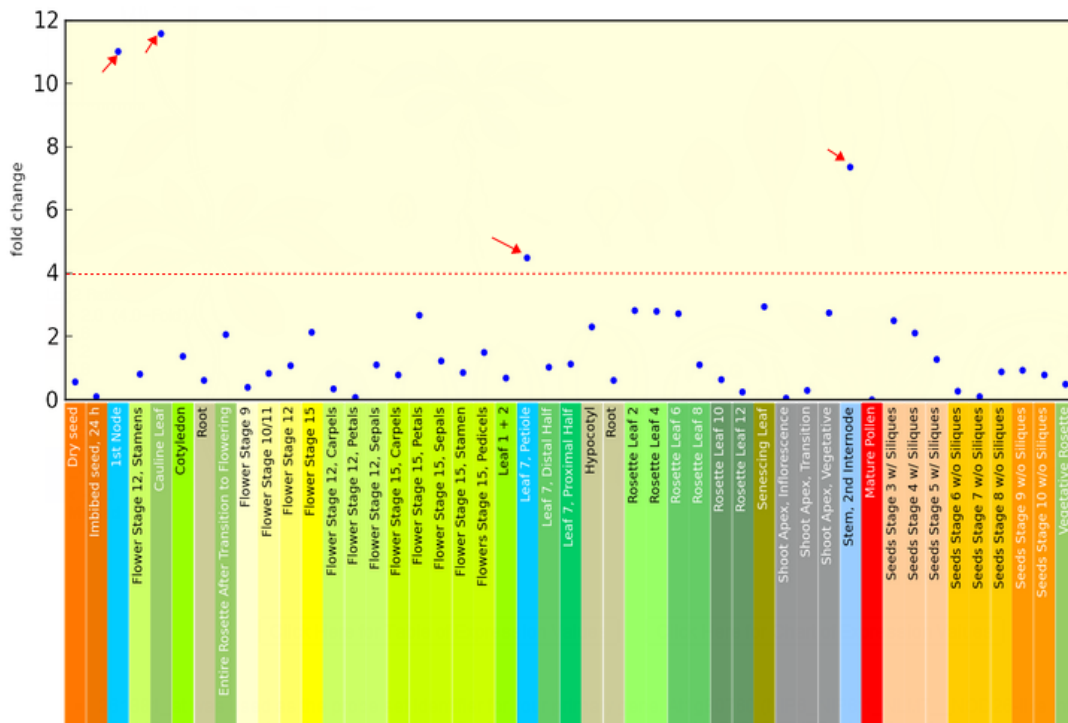
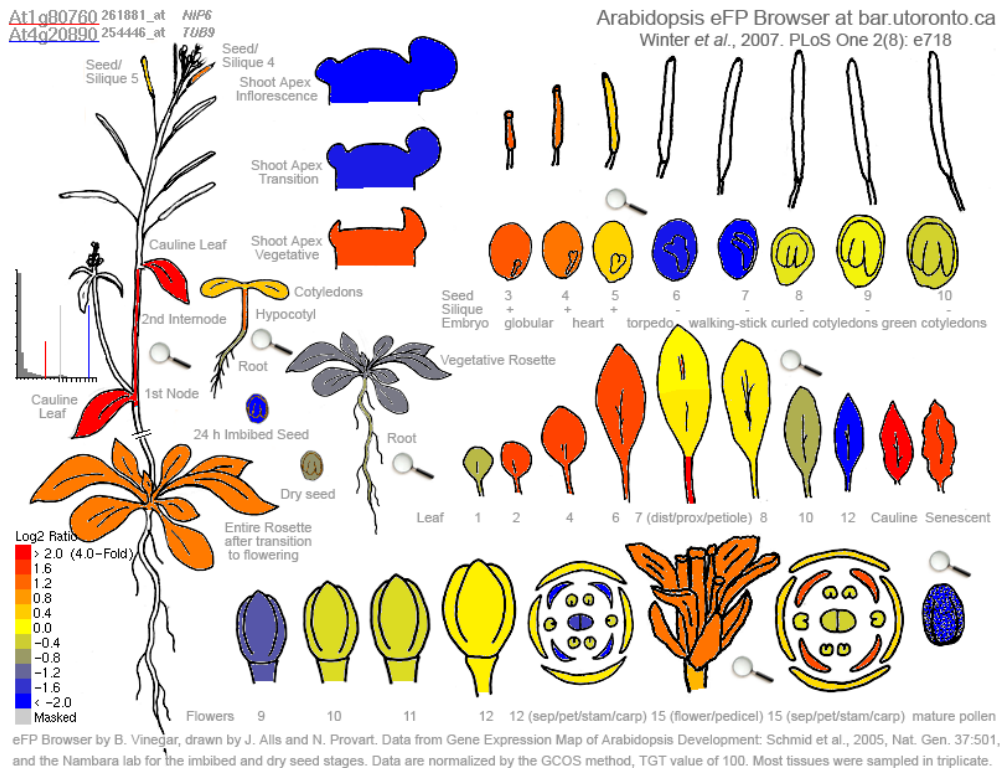


Figura 11. Análise eletrônica de *Northern*, ferramenta disponível no *Bio Array Resource* (BAR), no intuito de verificar o padrão de expressão do gene *Lsi6* (os tecidos com maior expressão gênica estão realçados em vermelho). Corroborando os resultados da análise, uma linha tracejada delimita os quatro tecidos (indicados por setas) que apresentaram expressão do gene *Lsi6* aumentada em mais de quatro vezes.

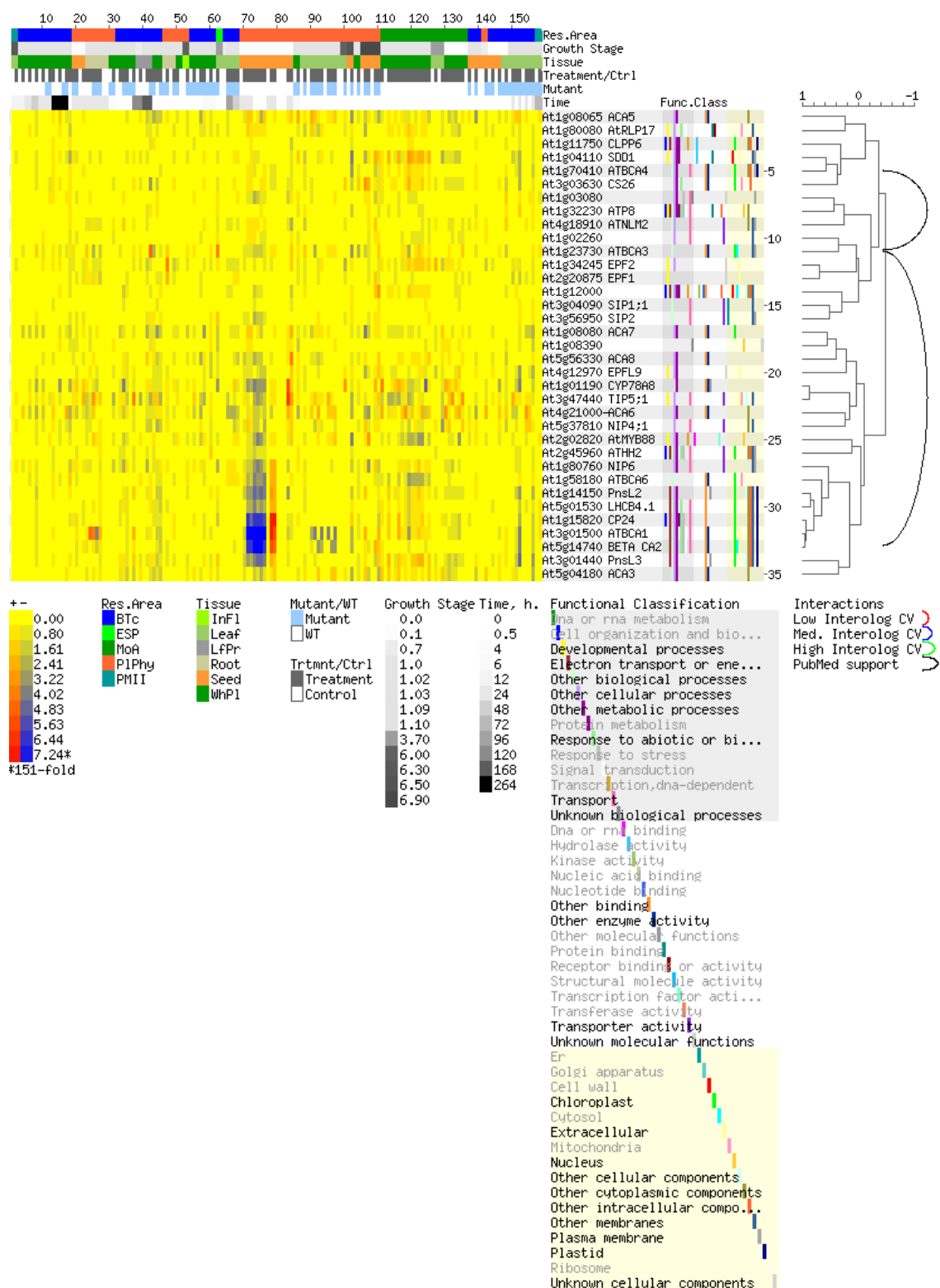
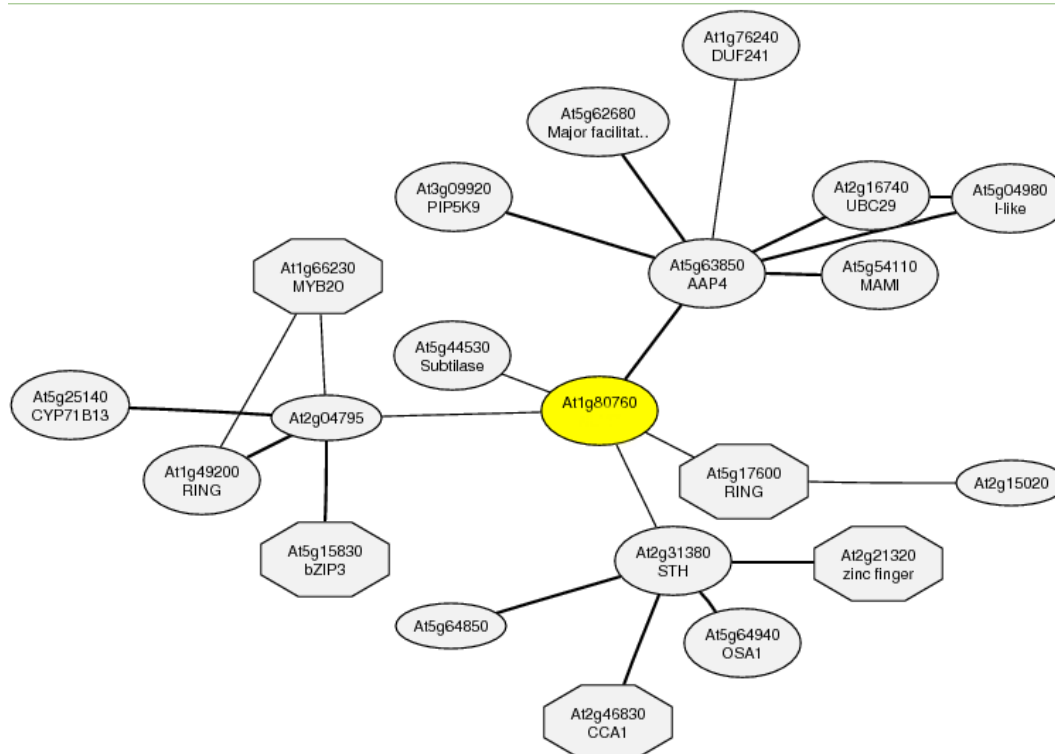


Figura 12. Cluster hierárquico e mapa de calor dos genes relacionados com a atividade da anidrase carbônica, condutância estomática ao vapor de água, fotossíntese, aquaporinas e transportadores de Si.



Ranking mútuo	Coefficiente de correlação	Locus	Função
2,5	0,56	At5g63850	Aminoácido permease 4
6,5	0,59	At2g31380	Homólogo da tolerância à salinidade
7,5	0,55	At2g04795	-
16,2	0,47	At5g44530	Proteína da família subtilase
20,5	0,49	At5g17600	Proteína da superfamília box Ring/U

Figura 13. Análise de coexpressão do gene homólogo do *Lsi6* em *Arabidopsis* (At1g80760), obtido de dados de microarranjo usando a ferramenta *CoexViewer* do ATTED-II 5.2. Na tabela complementar, são listados o ranking mútuo, a correlação, o *locus* e a função dos genes diretamente conectados com o At1g80760 na rede de coexpressão. A listagem completa de genes coexpressos com o gene *Lsi6* está disponível no endereço eletrônico do ATTED: http://atted.jp/cgi-bin/coex_Ath.cgi?gene=844415&top=2000.

Tabela 5. Lista de alguns genes coexpressos com *Lsi6* (At1g80760) mostrando o locus, Alias, ranking mútuo e função de cada gene.

Ranking mútuo	Locus	Alias	Função
63,5	At3g52720	CAH1	Codifica uma α AC no estroma cloroplastídico.
551,3	At1g70410	ATBCA4	Codifica uma putativa β AC do tipo 4. Junto com a β AC do tipo 1 (At3g01500) regulam o movimento estomático de CO ₂ nas células-guarda.
861,2	At2g39730	RCA	Codifica uma proteína cloroplastídica requerida para ativação da RuBisCO pela luz.
886,5	At5g23060	CaS	Codifica uma proteína cloroplastídica sensível ao Ca ²⁺ , que é essencial para a regulação estomática.
917,7	At1g15820	CP24	Codifica para uma proteína do complexo coletor de luz do FSII.
969,7	At5g14740	BETA CA2	Codifica para uma β AC citosólica.
1030,9	At3g47470	LHCA4	Codifica uma proteína ligada mais a clorofila a/b do FSI do que do FSII.
1211,7	At3g54890	LHCA1	Codifica um componente do complexo coletor de luz associado ao FSI.
1213,8	At1g19150	LHCA6	Codifica uma proteína ligada mais a clorofila a/b do FSI.
1263,5	At1g61520	LHCA3	Codifica uma proteína ligada mais a clorofila a/b do FSI.
1290,6	At1g23730	ATBCA3	β CA envolvida no uso do carbono.
1380,0	At1g60270	BGlu6	Metabolismo de carboidratos.
1353,9	At2g45960	ATHH2	Codifica para aquaporinas.
1563,9	At1g45474	LHCA5	Codifica para uma proteína do complexo coletor de luz do FSI.
1737,0	At1g14150	PnsL2	Codifica para a subunidade do complexo

			NAD(P)H desidrogenase localizado no lúmem tilacoidal do cloroplasto.
1739,7	At5g01530	LHCB4.1	Codifica para proteína do complexo coletor de luz do FSII.
1994,2	At1g54350	ABCD2	Codifica para transportadores da família ABC.
2320,5	At3g13320	CAX2	Codifica para transportadores de cátions na membrana.
2323,2	At1g21440	Carboxylase	Codifica para uma proteína da família da fosfoenolpiruvato carboxilase.

Tabela 6. Efeito do inibidor da abundância de aquaporinas, HgCl_2 (0 ou $50\mu\text{M}$, respectivamente, $-\text{HgCl}_2$ e $+\text{HgCl}_2$) e fertilização com Si (0 ou 2 mM, respectivamente, $-\text{Si}$ e $+\text{Si}$) fornecidos no período de maior expressão do gene *Lsi6* nos parâmetros de trocas gasosas obtidos *in situ* [taxa fotossintética (*A*), condutância estomática ao vapor de água (g_s), concentração interna de CO_2 (C_i) e taxa transpiratória (*E*)], nos parâmetros derivados de curvas *A-C_c* [concentração de CO_2 no cloroplasto (C_c), condutância do mesófilo (g_m), e taxa fotorespiratória (*FR*)], em arroz cv. ‘Oochikara’ cultivado em solução nutritiva, aos 100 dias após transplântio. Todos os dados foram obtidos de folhas bandeira (n = 6).

	-Si		+Si		ANOVA (valor <i>p</i>)		
	-HgCl ₂	+HgCl ₂	-HgCl ₂	+HgCl ₂	Si	HgCl ₂	Si*HgCl ₂
<i>A</i> ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	21,1Aa	17,8Bb	22,2Aa	20,7Ba	0,0006	0,0001	0,0923
g_s ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	0,33Aa	0,28Ba	0,35Aa	0,28Aa	0,7095	0,0001	0,4784
C_i ($\mu\text{mol mol}^{-1}$)	270Aa	273Aa	264Aa	252Ba	0,0116	0,3798	0,1691
<i>E</i> ($\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	3,39Ba	3,63Aa	4,25Aa	4,16Aa	0,0024	0,7106	0,3969
g_m ($\text{mmol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	0,26Aa	0,14Bb	0,29Aa	0,26Aa	0,0001	0,0001	0,0067
C_c ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$)	185Aa	149Bb	186Aa	170Aa	0,1048	0,0007	0,1397
<i>FR</i> ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	6,49Aa	7,02 Aa	6,61Aa	6,80Aa	0,9062	0,3940	0,6860

Letras maiúsculas denotam comparações dentro dos níveis de Si, e letras minúsculas dentro dos níveis de HgCl_2 .

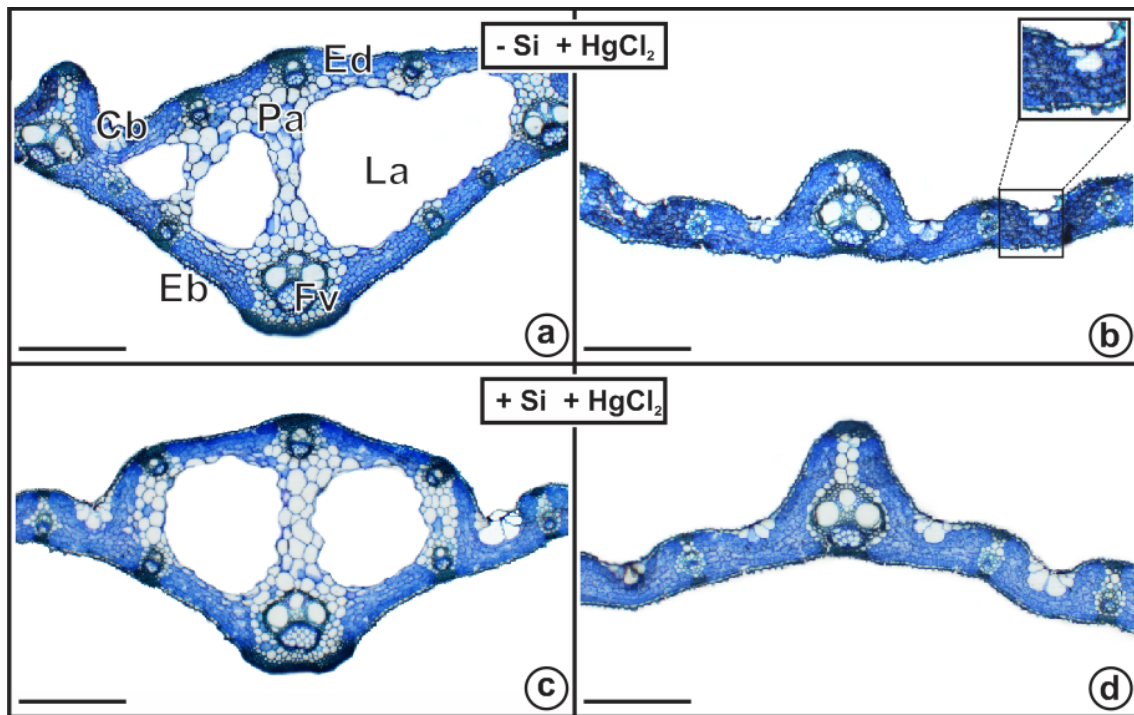


Figura 14. Nervura da região mediana da folha de arroz nos tratamentos $-Si+HgCl_2$ (A) e $+Si+HgCl_2$ (C); Deposição de composto de coloração preta (possivelmente Hg^+) apenas na parede celular das células do mesofilo apenas no tratamento $-Si+HgCl_2$ (B, D). Legenda: Ed= epiderme adaxial, Pa= parênquima, La= lacuna; Cb= célula buliforme; Fv= feixe vascular; Eb= epiderme abaxial. Barra = 200 μm .

CAPÍTULO 2

O SILÍCIO CONTROLA A FORMAÇÃO DA PLACA DE FERRO E DA BARREIRA CONTRA A PERDA RADIAL DE OXIGÊNIO EM RAÍZES DE ARROZ

1. INTRODUÇÃO

O alagamento é um dos estresses abióticos de maior impacto na sobrevivência de plantas (Ponnamperuma 1984; Ranathunge et al., 2011), sendo caracterizado pela baixa disponibilidade de O₂ (hipoxia), devido a um preenchimento dos poros do solo pela água, acarretando uma diminuição na concentração de O₂ tanto no solo quanto nas plantas (Bailey-Serres e Voesenek, 2008). Com a falta de O₂, a fosforilação oxidativa é bloqueada e o metabolismo aeróbico é substituído pelo anaeróbico, tendo um desvio para a rota glicolítica fermentativa. Além disso, em áreas alagadas a concentração de ferro (Fe) é dramaticamente aumentada, podendo causar toxidez às plantas (Armstrong, 1967). Devido à perda radial de O₂ (PRO) no sistema radicular, o Fe pode ser oxidado na rizosfera em óxidos e/ou hidróxidos, formando compostos precipitados na superfície da raiz, conhecidos como placas de Fe (Armstrong, 1967), que podem, além de paralisar o crescimento radicular, conduzir ao fechamento do canal de absorção de Fe quando esse elemento atinge níveis potencialmente tóxicos (Wu et al., 2012). Considerando-se que a capacidade de oxidação da raiz da planta é o principal fator que controla a formação da placa de Fe, a PRO torna-se de particular importância.

O arroz é frequentemente cultivado em áreas alagadas (Ponnamperuma, 1984), e a capacidade de tolerar períodos intermitentes de alagamento em alguns genótipos deve-se a modificações anatômicas em nível de raiz, tais como aumento no transporte de O₂, da parte aérea para raiz, via formação de aerênquima, e também pela formação de uma barreira contra a PRO (Drew et al., 2000; Abiko et al., 2012). Ressalta-se que a barreira contra a PRO é formada apenas nas regiões basais de raízes adaptadas ao alagamento, sendo que a concentração de O₂ próxima à superfície do ápice é relativamente elevada, enquanto a concentração de O₂ na superfície radicular é extremamente baixa a partir de 30 mm do ápice (Abiko et al., 2012). Armstrong (1967) verificou que a menor concentração de O₂ em superfície nas regiões basais das raízes ocorreu em paralelo a uma maior pressão parcial de O₂ no aerênquima dessas regiões, a qual foi diminuindo

em gradiente curvilíneo, até chegar ao ápice. A maior pressão de O₂ no aerênquima associada com uma menor PRO nas proximidades da base da raiz indicam que a permeabilidade ao movimento do O₂ através da última camada de células foi muito baixa em regiões basais. Ao diminuir PRO para o meio externo, a barreira formada estimula a difusão longitudinal de O₂ em direção ao ápice, favorecendo uma maior concentração de O₂ no ápice, e possivelmente, um maior crescimento axial da raiz, o que pode ser desejável por ampliar a absorção de nutrientes (Hodge et al., 2009). Posteriormente, Nishiuchi et al. (2012) evidenciaram que a indução da barreira contra a PRO exacerbaria a chegada de O₂ em regiões próximas ao ápice radicular, aumentando ainda mais, a quantidade de aerênquima nessa região.

Para melhor entender o funcionamento das raízes de arroz em condição de hipoxia, Ranathunge et al. (2011) avaliaram a formação da barreira contra a PRO em raízes de arroz cultivadas hidroponicamente em meio aerado e não aerado, verificando, mediante testes histoquímicos, aumentos na formação de estrias de Caspari na exoderme e endoderme, bem como na lignificação do esclerênquima apenas em raízes expostas ao meio não aerado. Em adição, a quantidade total de suberina, de lignina e de compostos aromáticos esterificados, como os ácidos cumárico e ferúlico, foram significativamente aumentadas na barreira contra a PRO a expensas de um menor crescimento axial em raízes cultivadas em tal condição. O arroz é uma cereal hiperacumulador de silício (Si) (Ma et al., 1989), e diversos trabalhos evidenciam os benefícios do fornecimento desse elemento à cultura do arroz em condição de estresse (Rodrigues et al., 2004; Kim et al., 2002). Apesar de a maior parte do Si absorvido ser transportado para a parte aérea via fluxo transpiracional, sendo acumulado como sílica na epiderme de tecidos da folha, colmo e grãos, o pequeno percentual de Si retido na raiz ($\leq 3\%$) tem um papel importante nesse tecido (Hattori et al., 2003). Fleck et al. (2011) verificaram que o Si pode aumentar a abundância de genes relacionados com a síntese de suberina e de lignina em raízes de arroz, mesmo na ausência de estresse. Pavilovic et al. (2013) demonstraram que, sob deficiência de Fe, o Si pode influenciar o metabolismo dos fenilpropanóides em raízes de pepino. Além disso, Fleck et al. (2011) verificaram que o fornecimento de Si induziu a aumentos na formação de estrias de Caspari e suberina na exoderme e endoderme, na lignificação do esclerênquima em paralelo a uma redução no poder oxidativo apenas nas regiões basais da raiz, enquanto nas proximidades do ápice (entre 0 a 5 cm) o poder oxidativo da rizosfera foi mantido. Como o experimento de Fleck et al. (2011) foi conduzido em condições não estressantes

e a taxa de crescimento de raiz não foi afetada pelo Si, a alteração na formação de suberina e de lignina foi atribuída a um efeito direto do Si. Os resultados obtidos por Fleck et al. (2011) diferiram em relação aos de Okuda e Takahashi (1964), que verificaram um maior poder oxidante em raízes fertilizadas com Si, em paralelo a uma deposição de Fe na superfície da raiz e, conseqüentemente, uma menor absorção de Fe. Por sua vez, a adição de Si em meio de cultivo rico em Fe fez decrescer a deposição de placa de Fe na superfície radicular e a absorção de Fe pelas raízes, e restabeleceu o alongamento radicular, que havia sido inibido por excesso de Fe no meio de cultivo (You-Qiang et al., 2012). Mediante análises de varredura associada com microanálise de raios-X, poder-se-iam obter maiores subsídios para explicar os efeitos do Si, *per se*, nessas respostas.

Na década de 1980, acreditava-se que a formação de barreira contra a PRO poderia também interferir na absorção de água e íons (Clark e Harris, 1981). Evidências recentes mostram que a barreira contra a PRO não afeta a condutividade hidráulica radicular, ao menos à água (Ranathunge et al., 2011). Raízes de plantas cultivadas sob alagamento possivelmente alteram a anatomia e fisiologia para equacionar a necessidade de nutriente e água e, ao mesmo tempo, reter um adequado suprimento de O₂ na raiz para um adequado funcionamento dos processos que ocorrem em nível radicular. Além disso, a PRO pode ser benéfica por facilitar a oxidação de compostos contendo Fe na superfície da raiz, diminuindo, assim, a absorção desse elemento em níveis tóxicos (Hodge et al., 2009). Levando-se em conta tais informações, sugere-se, aqui, que a formação da barreira contra a PRO atuaria sinergisticamente com placas de Fe para diminuir a absorção excessiva de Fe em raízes de plantas de arroz fertilizadas com Si, promovendo mudanças anatômicas e fisiológicas que permitiriam aumentos na capacidade do arroz em suportar estresses.

O presente estudo foi conduzido para responder as seguintes questões: i) Em presença de Si haveria, além da formação de uma barreira contra a PRO e mudanças morfoanatômicas em nível radicular, a formação de placas de Fe na superfície radicular, ainda que em condições não estressantes? ii) Como tais mudanças afetariam a absorção de Si pelas raízes?

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material vegetal e condições de cultivo

O experimento foi conduzido na Universidade Federal de Viçosa (UFV) (20°45' S, 42°54' W, 650 m de altitude), no sudeste do Brasil, usando plantas de arroz (*Oryza sativa* L. subsp. *japonica* da 'Oochikara') cultivadas hidroponicamente em vasos plásticos com capacidade de 5 L, contendo solução nutritiva não aerada, suplementada (+Si) ou não (-Si) com ácido monossilícico (H_4SiO_4) durante o período vegetativo (V – do transplantio até o início da formação da panícula). Com exceção dos parâmetros cinéticos de absorção do Si, que foram avaliados aos 45 dias após o transplantio (DAT), as análises foram realizadas aos 30 DAT.

Foi utilizada a solução nutritiva de Hoagland & Arnon (1950) com modificações, constituída de: 1,0 mmol L⁻¹ KNO₃; 0,25 mmol L⁻¹ NH₄H₂PO₄; 0,1 mmol L⁻¹ NH₄Cl; 0,5 mmol L⁻¹ MgSO₄.7H₂O; 1,0 mmol L⁻¹ Ca(NO₃)₂; 0,30 μmol L⁻¹ CuSO₄.5H₂O; 0,33 μmol L⁻¹ ZnSO₄.7H₂O; 11,5 μmol L⁻¹ H₃BO₃; 3,5 μmol L⁻¹ MnCl₂.4H₂O; 0,1 μmol L⁻¹ (NH₄)₆Mo₇O₂₄.4H₂O; 25 μmol L⁻¹ FeSO₄.7H₂O e 25 μmol L⁻¹ EDTA bisódico.

O H_4SiO_4 , obtido pela passagem do silicato de potássio através de uma coluna contendo resina trocadora de cátions (AMBERLITE IR-120B; H⁺ form; Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) na base, foi adicionado à solução nutritiva nas concentrações de 0 (-Si) ou 2 mmol Si L⁻¹ (+Si). A solução nutritiva foi completada diariamente e trocada a cada três dias, mantendo-se o pH entre 5,5 e 6,0. A constante troca de solução nutritiva foi feita ao invés de prover sistema de aeração para prevenir distúrbios mecânicos às raízes, uma importante consideração em estudos anatômicos (Vaculík et al., 2012). O experimento foi conduzido em casa de vegetação climatizada, com temperatura ajustada para 30 (± 2)°C, sob iluminação natural (~ 80% da radiação externa à casa de vegetação).

2.2. Quantificação de Si nas raízes

Amostras de raízes foram secas em estufa com circulação forçada de ar, a 72°C, até biomassa constante. As amostras secas foram trituradas com o auxílio de esferas

metálicas em um disruptor celular tipo *Mini Bead Beater* 96 (Biospec Products, Bartlesville, OK, EUA), até obtenção de um pó fino, a partir do qual foi determinada, colorimetricamente, a concentração de Si (Korndörfer et al., 1999).

2.3. Avaliações estruturais e de biomassa

Fragmentos com 2 cm do ápice da raiz foram excisados da planta com auxílio de lâmina de bisturi, e imediatamente fixados a vácuo em glutaraldeído 2,5% dissolvido em tampão cacodilato de sódio (0,1 M, pH 7,2), e armazenados a 4°C. A coleta foi feita às 12:00 h, em dia de céu aberto. Em paralelo, raízes tiveram os comprimentos medidos com auxílio de réguas graduadas, e, em seguida, foram submetidas à secagem em estufa com circulação forçada de ar, a 70°C, durante 72 h, para estimativa da biomassa.

2.3.1. Microscopia de luz

Amostras de raízes foram desidratadas em série etílica crescente e emblocadas em metacrilato (Historesina). O material emblocado foi seccionado transversalmente na região mediana, em micrótomo rotativo com avanço automático (modelo RM 2155, Leica Microsystems Inc., Derfield, EUA) com 5 µm de espessura, corados com azul de toluidina (pH 4,4) para metacromasia e montados em Permount. Após obtenção das imagens das secções transversais e longitudinais da raiz em microscópio estereoscópico, foram realizadas as análises micromorfométricas utilizando-se *softwares* específicos. Adicionalmente, foram feitos testes histoquímicos do material seccionado, para determinar a presença de amido, foi realizado o teste com lugol, e azul de anilina fluorescente para corar lignina, suberina e calose. No teste histoquímico com azul de anilina, foi utilizado o microscópio de fluorescência equipado com filtro para excitação por luz UV (Filtro 1, SPB 365/12), da Carl Zeiss.

2.3.2. Microscopia de varredura (MEV) e espectrometria de energia dispersiva de raios-X (EDS)

Amostras de raízes, com aproximadamente 2 cm de comprimento a partir do ápice radicular, foram desidratadas em série alcoólica de 30, 50, 70, 80, 95 e 100%, com intervalos de 10 min entre as trocas, realizando-se três passagens na última

concentração, no mesmo intervalo de tempo. Após a desidratação, os fragmentos foram submetidos à secagem ao ponto crítico, com uso do aparelho de ponto crítico (Critical Point Dryer, modelo CPD 030, Bal-Tec, Balzers, Liechtenstein), e montados sobre suportes metálicos de alumínio cobertos com fita adesiva dupla-face. Em seguida, parte das amostras foi evaporizada em carbono (Quorum Q150 T) e a outra parte coberta com ouro coloidal por metalização no aparelho “sputter coater” acoplado a um “freezing drying unit” (modelo FDU010, Bal-Tec, Balzers, Liechtenstein). Eletromicrografias foram obtidas em microscópio eletrônico de varredura LEO (modelo 1450 VP, Carl Zeiss, Cambridge, Inglaterra), operado a 10 kV, equipado com detector de energia dispersiva de raios-X (EDS), e as escalas micrométricas foram projetadas nas mesmas condições ópticas, utilizando o ródio (Rh) e o germânio (Ge) como padrões internos. Foram construídos mapas de localização dos elementos de interesse.

2.4. Fenilalanina amônia liase (FAL)

Amostras frescas da região do ápice radicular foram homogeneizadas em 400 μL de meio de extração contendo Tris (0,5 M, pH 8,5) suplementado com EDTA (1 mM), agitadas em vortex e centrifugadas a 4°C, por 10 min, a 13 000 g. O ensaio foi realizado utilizando-se uma alíquota de 50 μL do extrato obtido, 200 μL de meio de extração, e 50 μL de fenilalanina (300 μM); para o branco, em vez de alíquota de amostra foi utilizada água. Após aquecimento a 40°C, durante 1 h, foi realizada leitura a 290nm, sendo a concentração de ácido trans-cinâmico calculada usando o coeficiente de extinção molar de 104 L mmol^{-1} cm^{-1} . A unidade FAL equivaleu ao incremento de 0,001 de absorvância/ min^{-1} durante 60 min.

2.5. Lignina

A quantidade de lignina insolúvel (Klason) presente nas amostras foi determinada gravimetricamente. As amostras de ápices de raízes livres de extrativos foram secas a 45°C, sob vácuo. Aproximadamente 200 mg do material foi colocado em tubos de 100 mL. Foi adicionado 1 mL de H_2SO_4 72% (*m/m*) para cada 300 mg de amostra. Os tubos foram incubados a 30°C, por 60 min, e, após esse tempo, 84 mL de água destilada foram adicionados. As amostras foram então autoclavadas a 118°C, 27

psi, por 60 min. A lignina foi separada do material hidrolisado da parede celular por filtração e o resíduo lavado com água quente cuidadosamente, até a remoção máxima do material hidrolisado. O sedimento da lignina Klason foi então seco em estufa a 105°C e, em seguida, levado ao dessecador por 1 h, para então efetuar-se a pesagem. A lignina Klason foi determinada a partir da diferença do peso prévio do papel de filtro sem o resíduo de lignina e o posterior, com o resíduo de lignina (Gomide e Demuner, 1986).

A lignina solúvel, por sua vez, foi determinada de acordo com Fukushima e Hatfield (2003). Para tal, foram adicionados 250 µL de acetona para cada 1 - 1,5 mg de preparado isolado da parede celular; após evaporação completa da acetona, adicionaram-se 100 µL de solução de brometo de acetila (25% v/v de brometo de acetila dissolvido em ácido acético), e mantido a 50°C, durante 2 h. Após retornar à temperatura ambiente, foram adicionados 400 µL de hidróxido de sódio (2 M) e 70 µL de hidroxilamina ácido hidrocloreídrico (0,5 M). Após agitação vigorosa o volume foi completado para 2 mL com ácido glacial acético. Para leitura, utilizou-se submicrocubeta 701 M com capacidade de 100 µL (Precision Cells Inc.), com 0,85 cm de caminho óptico. O percentual de lignina solúvel em brometo de acetila (%LSBA) foi calculado com a fórmula: $\frac{Abs}{Coef \times 0,85 \text{ cm}} \times \frac{2 \text{ mL} \times 100\%}{\text{massa (mg)}}$ em que abs é a absorbância, coeff é um coeficiente adotado para espécies de gramíneas (17.75), 0,85 cm é o caminho óptico da cubeta utilizada. Foram feitas leituras em triplicata.

A lignina total foi dada pelo somatório das frações solúvel e insolúvel.

2.6. Porosidade das raízes

Raízes foram cortadas em segmentos de 0-2, 2-4 e 4-6 cm a partir do ápice, constituindo três repetições para cada segmento, e coradas com azul de anilina. Após coloração, cada grupo foi cuidadosamente seco em meio a uma bicamada de papel filtro qualitativo de 10,5 cm x 10,5 cm (F. Maia Inc.) e pesado. Posteriormente, os segmentos foram submetidos a vácuo, para forçar a substituição do oxigênio por água no tecido analisado, usando-se bomba de vácuo à pressão de -20 mPa, durante 30 min, após o qual os segmentos de raízes foram novamente secos e pesados. A diferença de peso antes e depois do tratamento com vácuo e entrada de água foi considerada como sendo a porosidade da raiz, resultando em uma estimativa da magnitude do aerênquima formado em cada segmento (Holzschuh et al., 2010).

2.7. Cinética de absorção de Si

O estudo de cinética de absorção de Si foi realizado pelo método de exaustão, omitindo-se o Si por 24 h. Em seguida, outra solução nutritiva, contendo a mesma concentração de Si que a anterior, 2 ou 0,2 mM, foi adicionada em um volume de 2 L. Após 30 min, tempo este suficiente para que as plantas atingissem o estado estacionário (Epstein e Hagen, 1952) em relação ao Si, iniciou-se a coleta das amostras da solução. Foram coletadas amostras de 10 mL a cada 15 min nas primeiras 2 h; a cada 30 min nas 4 h seguintes; a cada 60 min nas 6 h subsequentes, ao final de 24 h, e quando necessário, continuou-se a coleta de 12 em 12 h, até que a concentração de Si ficasse constante. O volume dos vasos foi mantido constante, repondo-se com água desionizada a amostra de solução retirada. Os dados da concentração de Si na solução de exaustão, em cada tempo de amostragem, bem como os dados relativos ao volume da solução nos vasos, tempo total de amostragem, volume da amostra e a massa da matéria seca de raiz, foram utilizados para calcular os parâmetros cinéticos de Michaelis-Menten, K_m e V_{max} , para cada repetição, empregando processo gráfico-matemático do programa CinéticaWin (versão para o Windows do Cinética 1.2) (Ruiz e Fernandes Filho, 1992). Na função de Michaelis-Menten, V_{max} é a taxa máxima de absorção e o K_m é a constante de Michaelis-Menten, a qual representa a afinidade do elemento em relação ao transportador. O C_{min} , que representa a concentração mínima a partir da qual a planta começa a absorver nutrientes da solução, foi estimado pela média dos valores da concentração de Si na solução de exaustão, a partir do ponto em que as concentrações de Si tenderam a permanecer constantes.

Os teores de Si na solução foram determinados por espectrofotometria de absorção atômica, em espectrofotômetro Varian (modelo Spectra 220 FS, Varian Inc., Mulgrave, Australia) acoplado com uma lâmpada cátodo-oco de Si (Photron Inc., Vitoria, Australia), a 251,6 nm.

2.8. Minerais

Considerando-se que os elementos minerais ferro (Fe) e cálcio (Ca) foram os que mais apresentaram variação no teor adsorvido na superfície de raízes fertilizadas com Si em relação às não, pelo método de varredura associada com detector de

elementos por raios-X, amostras secas de raízes foram moídas, pesadas e submetidas à uma digestão nitroperclórica (3:1), sendo o teor desses minerais determinados por espectrofotometria de absorção atômica, utilizando-se o espectrofotômetro de absorção atômica supramencionado realizando-se as leituras a 279,5 nm para o Fe, e a 422,7 nm para o Ca.

2.9. Estatística

Foi adotado um delineamento inteiramente casualizado, com seis repetições. A unidade experimental foi composta por um vaso com capacidade de 5,0 L, contendo seis plantas. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as comparações entre as médias dos tratamentos foram realizadas mediante teste F. As análises foram realizadas utilizando-se o Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas (SAEG, versão 9.1).

3. RESULTADOS

As concentrações médias de Si verificadas em raízes de plantas de arroz cultivadas sem ou com adição de Si durante o período vegetativo do ciclo (V) foram de, respectivamente, 0,32% e 1,89% (Figura 1). Por sua vez, o comprimento radicular específico das raízes de plantas que tiveram a solução nutritiva suplementada com Si foi diminuído em 37%, em relação ao das plantas cultivadas sem suplementação de Si (Figura 2). Uma vez que o comprimento foi menor e a biomassa não foi alterada, tal redução foi associada à ocorrência de raízes mais grossas, fato realçado pelas eletromicrografias de varredura da região compreendida entre 0 e 2 cm do ápice radicular (Figura 4). Adicionalmente, foram realizados cortes longitudinais nessa mesma região para quantificar o diâmetro das raízes. Levando-se em conta uma média dos valores medidos em quatro pontos por corte, padronizados em relação ao distanciamento da columela, o diâmetro de raízes +Si foi sobremaneira aumentado (Figura 2). Cabe enfatizar que o maior diâmetro foi devido a um aumento na área radicular como um todo, e não por um aumento da área da vasculatura (Figura 5, Tabela 1). Assim, a razão entre a área ocupada pelo feixe em relação à área total manteve-se inalterada. O mesmo padrão foi verificado no que se refere à relação entre o número de elementos de vaso em relação à área ocupada pelo feixe vascular (Figura 4, Tabela 1).

Notavelmente, as áreas da coifa e da columela foram diminuídas com o fornecimento de Si (Figura 3). Teste histoquímico utilizando o corante lugol permitiu a detecção de baixos níveis de amido ao longo do ápice da raiz, com exceção da região da columela, independentemente do fornecimento de Si (Figura 2). Com a redução na área da columela, observou-se menor presença de grãos de amido em raízes de plantas +Si (Figura 2). Além disso, foi identificado um maior espessamento nas células da endoderme (Tabela 1); sob luz fluorescente azul, foi visualizada uma maior suberização nas células esclerenquimatosas, bem como uma maior lignificação da endoderme e exoderme nas plantas tratadas com Si, enquanto nas não tratadas se verificou lignificação diferencial apenas na exoderme (Figura 5). Tais alterações anatômicas foram acompanhadas por uma maior atividade enzimática da fenilalanina amônia liase (Figura 6), em paralelo a um maior acúmulo de lignina em raízes tratadas com Si (Figura 6). Além disso, foi verificado um abrupto aumento na porosidade nos segmentos de ápices radiculares de plantas +Si (Figura 7). Análises micromorfométricas, realizadas em cortes transversais do ápice radicular, corroboraram

esse grau diferencial de porosidade (Figura 7), com valores de percentual de aerênquima três vezes maiores nas raízes fertilizadas com Si (Tabela 1).

Mediante análise de MEV associada com microanálise de raios-X, foi identificada a formação de compostos precipitados contendo Si-O-Fe nas proximidades da coifa, apenas em plantas supridas com Si (Figura 8). Ressalta-se que o percentual tanto de Si quanto de Fe adsorvidos à superfície das raízes foi aumentado em quatro vezes, em relação à de plantas não supridas com Si, em paralelo a uma diminuição na deposição de Ca (Tabela 2), existindo, ainda, uma forte associação entre Fe e Si exclusivamente no tratamento +Si. As concentrações de Fe e de Ca solúveis, por sua vez, foram sobremaneira diminuídas no interior das raízes de plantas +Si (Figura 9).

Aos 45 DAT, os valores dos parâmetros cinéticos da absorção de Si variaram com a concentração de Si na solução (Tabela 3). Os valores de K_m indicaram que, na concentração de 0,2 mM de Si, predomina um sistema de transporte de alta afinidade, enquanto em 2 mM de Si predominaria um sistema de baixa afinidade. Com a escassez de Si durante o período vegetativo, a planta aparentemente aumentou a quantidade de transportadores de alta afinidade nas raízes, o que maximizou a absorção de Si, quando esse elemento foi fornecido posteriormente. Por sua vez, com o fornecimento contínuo de Si ao longo do ciclo, a capacidade de transporte *per se* foi aumentada, devido à predominância de transportadores de baixa afinidade. Cabe ressaltar que as plantas que receberam Si após um período de escassez desse elemento apresentaram valores de C_{min} 57% inferiores em relação às plantas fertilizadas continuamente com Si (Tabela 3).

4. DISCUSSÃO

Aos 30 DAT, a concentração de Si em raízes de plantas cultivadas em solução nutritiva em presença de Si (+Si) foi aumentada em 5,91 vezes em relação à de plantas cultivadas na ausência desse elemento (-Si). Em maior concentração de Si o alongamento radicular foi restringido, mas sem afetar a biomassa, em paralelo a um aumento no diâmetro das raízes. Resultados similares ao do presente estudo são comumente verificados em plantas cultivadas em condição de estresse hídrico e/ou impedimento mecânico ao crescimento radicular (Iijima et al., 2003; Hodge et al., 2009; Bengough et al., 2011; Henry et al., 2012), enquanto relatos de inibição do crescimento axial radicular por Si são, pelo menos aparentemente, inexistentes. Fleck et al. (2011), por exemplo, verificaram que o fornecimento de Si não afetou a taxa de crescimento em raízes de arroz. Com efeito, diversos trabalhos evidenciam efeitos positivos (Hattori et al., 2003; Chen et al., 2010; Vaculík et al., 2012) ou marginais (Fleck et al., 2011; Pavilovic et al. 2013) do fornecimento de Si no crescimento axial de raízes. Hattori et al. (2003), por exemplo, observaram que o fornecimento de Si estimulou o crescimento axial de raízes do sorgo em paralelo a uma maior extensibilidade da parede celular (PC) na região apical e fortalecimento da endoderme na região basal.

A coifa participa do geotropismo e protege o meristema da raiz de danos mecânicos, via secreção de uma mucilagem na borda das células (Iijima et al., 2003), e, no presente estudo, a área dessa estrutura foi sobremaneira diminuída com o fornecimento de Si. Nesse contexto, é possível que o contato do Si com a coifa seja crucial para a inibição do crescimento radicular axial induzido pelo Si. Como o meristema ficou mais desprotegido, haveria uma menor reposição de células danificadas da coifa pelo centro quiescente (CQ), fato realçado pela pouca visualização do CQ apenas em raízes de plantas +Si. A menor concentração de grãos de amido nas células da columela, dissociada de aumento no alongamento radicular, é uma evidência circunstancial de que a energia gerada na ‘quebra’ do amido foi investida no crescimento radial de plantas +Si, o que se espera traduzir-se em mecanismos de tolerância em raízes do arroz fertilizadas com Si.

O mecanismo de tolerância à hipoxia verificado em algumas espécies, como é o caso do arroz, envolve o aumento no transporte de O₂, da parte aérea para raiz, via formação de aerênquima e/ou formação de uma barreira contra a perda radial de O₂ (PRO), que permitem aumentos gradativos na difusão do O₂, no sentido da base para o

ápice radicular (Abiko et al., 2012), e formação de placas de Fe na superfície da raiz, para diminuir a toxidez por excesso de Fe (Armstrong, 1967). A formação de barreira contra a PRO e a formação de placa de Fe em raízes de plantas cultivadas em áreas alagadas já foi bastante estudada, principalmente quando contaminadas por metais pesados (Liu et al., 2004; Chen et al., 2010; Moore et al., 2011). Em tal situação a PRO pode interferir na formação de placas de Fe para evitar a absorção demasiada de metais/metaloídes em concentrações potencialmente tóxicas (Liu et al., 2004; Moore et al., 2011; Chen et al., 2010; You-Qiang et al., 2012). No presente estudo, ao aumentar a suberização da exoderme e a lignificação do esclerênquima nos tecidos radiculares, o fornecimento de Si provavelmente esteve associado à criação de uma barreira à PRO, o que permitiria a chegada de mais O₂ no ápice radicular, afetando a quantidade de aerênquima, dentre outras características anatômicas no ápice da raiz, ainda que em condições não estressantes.

Além disso, o Si estimulou a atividade da enzima FAL, e promoveu um maior acúmulo de lignina em relação às raízes de plantas cultivadas sem suplementação de Si, sendo a diferença mais expressiva na atividade enzimática do que no produto final, sugerindo possíveis regulações alostéricas no composto formado. Recentemente, Fleck et al. (2009) demonstraram que a fertilização com Si controlou a expressão gênica de repetições ricas em leucina (RRL), domínios presentes na família de receptores do tipo cinase (RTQ) com mais de 1100 membros em arroz (Morillo e Tax, 2006). As RTQ caracterizadas em plantas participam de diversos processos, incluindo desenvolvimento, autoincompatibilidade, respostas aos patógenos, bem como a diversos estresses ambientais (Vij et al., 2008). Fleck et al. (2009) verificaram um considerável impacto da fertilização com Si no nível de expressão gênica de transcritos RRL-RTQ, reforçando a possibilidade dessa proteína regulatória ter papel central na percepção do sinal por Si, e/ou na promoção de alterações metabólicas associadas a percepção desse sinal. De qualquer modo, a maior atividade da FAL em paralelo a um maior acúmulo de lignina reforça evidências de que o Si atuaria como um sinalizador para reprogramação do metabolismo em nível de raiz (Fleck et al. 2011; Pavilovic et al. 2013), que passaria a desviar esqueletos de carbono do metabolismo primário para formar xiquimato, que é o precursor da rota dos fenilpropanóides, ainda que o custo energético para formação de compostos secundários, a exemplo da lignina, seja muito maior. Num futuro, análises de perfil metabólico na raiz poderão ser realizadas para validar esta sugestão.

Paralelamente à formação da barreira contra o PRO e ao aumento na quantidade

de aerênquima no ápice radicular, foi verificado, na superfície da raiz de plantas +Si, um aumento de 4,10 vezes na deposição de Fe, enquanto a deposição de Ca foi diminuída em 57,8% em relação àquelas em que o Si foi fornecido. Verificou-se, ainda, uma forte associação de Si com Fe apenas na superfície de raízes de plantas +Si, corroborando resultados obtidos por Moore et al. (2011). Ao contrário, You-Qiang et al. (2012) verificaram que o fornecimento de Si fez decrescer não apenas a precipitação de Fe^{2+} na superfície da raiz do arroz, mas também a fração solúvel de Fe nos espaços intercelulares das raízes. A concentração tanto de Fe como de Ca solúveis na raiz, medidos por espectrometria de absorção atômica, por sua vez, foram diminuídas em presença de Si. A parede celular na região apical da raiz é mais flexível, uma vez que está livre do espessamento secundário ocasionado pela maturação e/ou deposição de Si; sendo o cálcio (Ca) um constituinte da PC, a deficiência desse elemento pode afetar a extensibilidade da PC, e, conseqüentemente, restringir o crescimento axial das raízes (Hepler et al., 2005), o que talvez ajude a explicar as mudanças morfológicas verificadas em raízes tratadas com Si no presente estudo. Fleck et al. (2011) verificaram que, com uma maior pressão para a liberação do O_2 para a rizosfera, no ápice radicular, pela formação da barreira contra a PRO, as chances de formação de placa de Fe foram ampliadas, muito embora esses autores não tenham evidenciado deposição de Fe na superfície da raiz. Cabe reforçar que a placa de Fe e a barreira contra a PRO foram formadas apenas em raízes de plantas +Si, e a expensas de menor crescimento axial radicular, sugerindo a existência de um balanço entre o O_2 liberado na rizosfera que foi direcionado para a manutenção do crescimento axial, daquele que foi incorporado na placa para evitar uma possível toxidez por Fe. Registra-se que, até então, não havia relatos de simultânea formação de barreira contra a PRO e da placa de Fe em plantas fertilizadas com Si em condição não estressante, bem como dos efeitos sinérgicos dessas formações impondo mudanças compensatórias na morfologia radicular para conferir uma presumível maior tolerância a estresses.

No arroz, os genes *Low silicon rice 1* e *2* (*Lsi1* e *Lsi2*) codificam para isoformas de aquaporinas que atuam na absorção do Si, na forma de H_4SiO_4 , pelas raízes (Ma et al., 2006; Ma e Yamaji, 2006). Entretanto, a expressão de tais genes é regulada pelo nível de Si, sendo que o fornecimento de Si decresce em $\frac{1}{4}$ a expressão desses genes em raízes de arroz (Yamaji e Ma, 2006; 2008; 2009). Esses resultados são consistentes com os resultados do estudo dos parâmetros cinéticos de absorção, indicando a predominância de dois sistemas de transporte, no qual em baixa concentração (0,2 mM

Si) de Si predomina um sistema de alta afinidade, enquanto sob concentrações elevadas (2 mM Si) predomina sistema de baixa afinidade. Além disso, os resultados sugerem um aumento na quantidade de transportadores quando o Si foi fornecido após um período de escassez, atingindo valores de V_{\max} similares aos verificados em plantas cultivadas continuamente em meio +Si. De fato, raízes de plantas +Si apresentaram maior valor de C_{\min} em relação ao de plantas -Si, indicando uma menor eficiência de absorção quando o Si é fornecido em solução, contrabalanceada por um maior V_{\max} , uma vez que a capacidade de transporte *per se* deve ter sido aumentada. É possível que o menor diâmetro de raízes -Si possa ter contribuído para aumentar a velocidade de absorção desse elemento em relação à de plantas +Si. Isso porque a deposição de compostos fenólicos na exoderme e endoderme associada com a deposição de Fe em superfície provavelmente não obstruíram as aquaporinas em magnitude suficiente para criar uma barreira à absorção de Si. Ranathunge et al. (2011) confirmaram que a barreira contra a PRO não limita o transporte de água em raízes de arroz, fato justificado pois esta molécula tem diâmetro apenas de 2,8 Å e não tem carga. Ainda de acordo com esses autores, a permeabilidade de solutos com diâmetro maior ou igual ao do Na é dificultada; isso porque o diâmetro do Na, em sua forma hidratada, é de 8 Å, e dado a sua carga positiva, esse elemento é atraído à parede celular negativamente carregada. O H_4SiO_4 não tem carga e o seu diâmetro atômico calculado é de 5,7 Å, sendo, portanto, improvável a inibição completa da absorção de Si em raízes de plantas +Si.

Os resultados do presente estudo permitiram evidenciar que o Si, *per se*, pode agir como um sinal para promover a formação simultânea de barreira contra a PRO e da placa de Fe em plantas de arroz, de modo similar ao que acontece em condição de estresse, culminando em mudanças compensatórias na morfologia radicular para conferir uma presumível maior tolerância às condições adversas do meio de cultivo, com pouco efeito na absorção de Si. Coletivamente, estas informações reforçam a importância da fertilização com Si em nível radicular para aumentar a tolerância a estresse. Tais alterações morfoanatômicas e fisiológicas mediadas por Si precisam ser melhor detalhadas tanto em nível metabólico quanto molecular.

REFERÊNCIAS

- Abiko, T.;Kotula, L.;Shiono, K.;Malik, A. I.;Colmer, T. D.;Nakazono, M. Enhanced formation of aerenchyma and induction of a barrier to radial oxygen loss in adventitious roots of *Zea nicaraguensis* contribute to its waterlogging tolerance as compared with maize (*Zea mays ssp. mays*). **Plant, Cell and Environment** **35**: 1618 - 1630, 2012.
- Ahmed M., Hassen F., and Khurshid Y., 2011.Does silicon and irrigation have impact on drought tolerance mechanism of sorghum? **Agriculture and Water Management** **98**: 1808 - 1812.
- Armstrong, W. Oxidising activity of roots in waterlogged soils. **Plant Physiology** **20**: 920 - 926, 1967.
- Bailey-Serres, J.; Voesenek, L. A. Flooding stress: acclimations and genetic diversity.**Annual Review of Plant Biology** **59**: 313 -339, 2008.
- Balakhnina, T.; Borkowska, A. Effects of silicon on plant resistance to environmental stresses: review. **International Agrophysics** **27**: 225 - 232, 2013.
- Bengough, A. G.; McKenzie, B. M.; Hallett, P. D.; Valentine, T. A. Root elongation, water stress, and mechanical impedance: a review of limiting stresses and beneficial root tip traits. **Journal of Experimental Botany** **62**: 59 - 68, 2011.
- Chen, Z.; Zhu, Y. G.; Liu, W. J.; Meharg, A. A. Direct evidence showing the effect of root surface iron plaque on arsenite and arsenate uptake into rice (*Oryza sativa*) roots. **New Phytologist** **165**: 91 - 97, 2010.
- Clark, L. H.; Harris, W. H. Observation on the root anatomy of rice (*Oryza sativa* L.). **American Journal of Botany** **68**: 154 - 161, 1981.
- Detmann, K. C.; Araújo, W. L.; Martins, S. V. C.; Fernie, A. R.; DaMatta, F. M. Metabolic alterations triggered by silicon nutrition: Is there a signaling role for silicon? **Plant Signaling & Behavior** **8**: e22523-3, 2013.
- Drew, M. C.; He, C. J.; Morgan, P. W. Programmed cell death and aerenchyma formation in roots. **Trends in Plant Science** **5**: 123 - 127, 2000.
- Fleck, A. T.; Nye, T.; Repenning, C.; Stahl, F.; Marc Zahn, F. M.; Schenk, M. K. Silicon enhances suberization and lignification in roots of rice (*Oryza sativa*). **Journal of Experimental Botany** **62**: 2001 - 2011, 2011.
- Fukushima, R. S.; Hatfield, R. D. Espectros de duas formas de lignina obtidos por ressonância magnética nuclear. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** **38**: 505 - 511, 2003.

- Gomide, J. L.; Demuner, B. J. Determinação do teor de lignina em material lenhoso método Klason modificado. **O Papel** **47**: 36 - 38, 1986.
- Gunes, A.; Inal, A.; Bagci, E. G.; Coban, S. Silicon-mediated changes on some physiological and enzymatic parameters symptomatic of oxidative stress in barley grown in sodic-B toxic soil. **Journal of Plant Physiology** **164**: 807 - 811, 2007.
- Hattori, T.; Inanaga, S.; Tanimoto, E.; Lux, A.; Luxová, M.; Sugimoto, Y. Silicon-Induced changes in viscoelastic properties of sorghum root cell walls. **Plant and Cell Physiology** **44**: 743 - 749, 2003.
- Henry, A.; Cal, A. J.; Batoto, T. C.; Torres, R. O.; Rachid Serraj, R. Root attributes affecting water uptake of rice (*Oryza sativa*) under drought. **Journal of Experimental Botany** **63**: 4751 - 4763, 2012.
- Hepler, P. K. Calcium: A Central Regulator of Plant Growth and Development. **The Plant Cell** **17**: 2142 – 2155, 2005.
- Hodge, A.; Berta, B.; Doussan, C.; Merchan, F.; Crespi, M. Plant root growth, architecture and function. **Plant and Soil** **321**: 153 - 187, 2009.
- Holzschuh, M. J.; Bohnen, H.; Anghinoni, I. Avaliação da porosidade e placa fêrrica de raízes de arroz cultivado em hipoxia. **Revista Brasileira de Ciência do Solo** **34**: 1763-1769, 2010.
- Iijima, M.; Higuchi, T.; Barlow, P. H. Contribution of root cap mucilage and presence of an intact root cap in maize (*Zea mays*) to the reduction of soil mechanical impedance. **Annals of Botany** **94**: 473 - 477, 2004.
- Kim, S. G.; Kim, K. W.; Park, E. W.; Choi, D. Silicon-induced cell wall fortification of rice leaves: a possible cellular mechanism of enhanced host resistance to blast. **Phytopathology** **92**: 1095 - 1103, 2002.
- Liu, W. J.; Zhu, Y. G.; Smith, F. A.; Smith, S. E. Do iron plaque and genotypes affect arsenate uptake and translocation by rice seedlings (*Oryza sativa* L.) grown in solution culture? **Journal of Experimental Botany** **55**: 1707 - 1713, 2004.
- Ma, J. F.; Nishimura, K.; Takahashi, E. Effect of silicon on the growth of rice plant at different growth stages. **Soil Science and Plant Nutrition** **35**: 347 - 356, 1989.
- Ma, J. F.; Tamai, K.; Yamaji, N.; Mitani, N.; Konishi, S.; Katsuhara, M.; Ishiguro, M.; Murata, Y.; Yano, M. A silicon transporter in rice. **Nature** **440**: 688 - 691, 2006.
- Ma, J. F.; Yamaji, N. Silicon uptake and accumulation in higher plants. **Trends in Plant Science** **11**: 1 - 6, 2006.

Moore, K. L.; Schröder, M.; Wu, Z.; Martin, B. G. H.; Hawes, C. R.; McGrath, S. P.; Hawkesford, M. J.; Ma, J. F.; Grovenor, C. R. M. High-resolution secondary ion mass spectrometry reveals the contrasting subcellular distribution of arsenic and silicon in rice roots. **Plant Physiology** **156**: 913 - 924, 2011.

Morillo, S. A.; Tax, F. E. Functional analysis of receptor-like kinases in monocots and dicots. **Current Opinion in Plant Biology** **9**: 460-469, 2006.

Okuda, A.; Takahashi, E. Studies on the physiological role of silicon in crop plant. In: Effect of various amount of silicon supply on the growth of rice plant and its nutrients uptake. **Journal of the Science Soil and Manure, Japan** **32**: 533 - 537, 1961.

Pavlovic, J.; Samardzic, J.; Maksimovi, V.; Timotijevic, G.; Stevic, N.; Laursen, K. H.; Hansen, T. H.; Husted, S.; Schjoerring, J. K.; Liang, Y.; Nikolic, M. Silicon alleviates iron deficiency in cucumber by promoting mobilization of iron in the root apoplast. **New Phytologist** **198**: 1096 - 1107, 2013.

Ponnamperuma, F. N. Effects of flooding on soils. In: Kozłowski, T. T. **Flooding and plant growth**. Academic Press, San Diego, 1984. p. 10 - 45.

Ranathunge, K.; Lin, J.; Steudle, E.; Schreiber, L. Stagnant deoxygenated growth enhances root suberization and lignifications, but differentially affects water and NaCl permeabilities in rice (*Oryza sativa* L.) roots. **Plant, Cell and Environment** **34**: 1223 - 1240, 2011.

Rodrigues, F. Á.; McNally, D. J.; Datnoff, L. E.; Jones, J. B.; Labbé, C.; Benhamou, N.; Menzies, J. G.; Bélanger, R. R. Silicon enhances the accumulation of diterpenoid phytoalexins in rice: a potential mechanism for blast resistance. **Phytopathology** **94**: 177 - 183, 2004.

Ruiz, H. A.; Fernandes-Filho, E. I. Cinética: Software para estimar as constantes V_{max} e K_m da equação de Michaelis-Menten. In: **Anais da reunião brasileira de fertilidade do solo e nutrição de plantas**. Piracicaba: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, p. 124 - 125, 1992.

Savant, N. K.; Snyder, G. H.; Datnoff, L. E. Silicon management and sustainable rice production. **Advances in Agronomy** **58**: 151 - 199, 1997.

Vaculík, M.; Landberg, T.; Greger, M.; Luxová, M.; Stoláriková, M. S.; Lux, A. Silicon modifies root anatomy, and uptake and subcellular distribution of cadmium in young maize plants. **Annals of Botany** **110**: 433 - 443, 2012.

- Vij, S.; Giri, J.; Dansana, P. K.; Kapoor, S.; Tyagi, A. K. The receptor-like cytoplasmic kinase (*OsRLCK*) gene family in rice: organization, phylogenetic relationship, and expression during development and stress. **Molecular Plant** **1**:732 – 750, 2008.
- Yamaji, N.; Ma, J. F. Silicon transporter *Lsi6* at the node is responsible for inter-vascular transfer of silicon in rice. **Plant Cell** **21**: 2878 - 2883, 2009.
- Yamaji, N.; Mitatni, N.; Ma, J. F. A transporter regulating silicon distribution in rice shoots. **Plant Cell** **20**: 1381 - 1389, 2008.
- You-Qiang, F.; Hong, S.; Dao-Ming, W.; Zheng, C. K. Silicon-mediated amelioration of Fe²⁺ toxicity in rice (*Oryza sativa* L.) roots. **Pedosphere** **22**: 795 - 802, 2012.

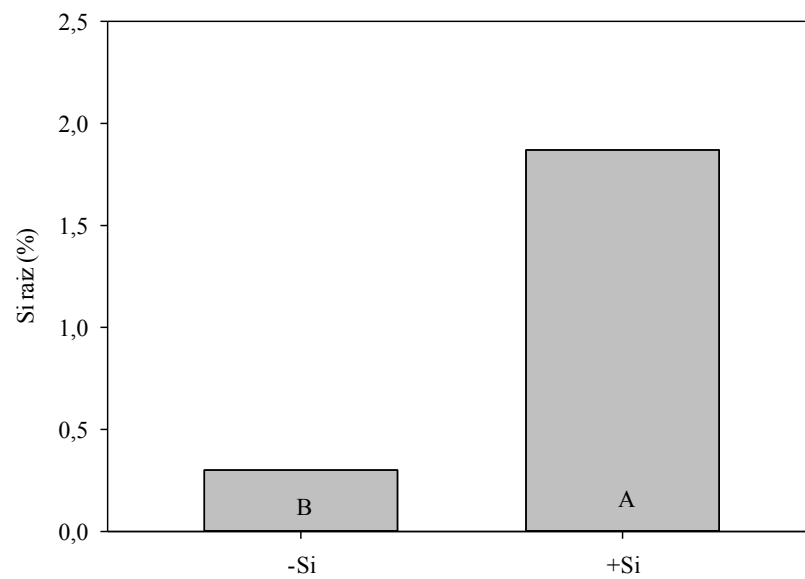


Figura 1. Concentração de Si (% da massa seca) na raiz de plantas de arroz fertilizadas (+Si) ou não (-Si) com Si aos 30 dias após o transplântio ($n = 6 \pm EP$). As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste F, a 5% de probabilidade.

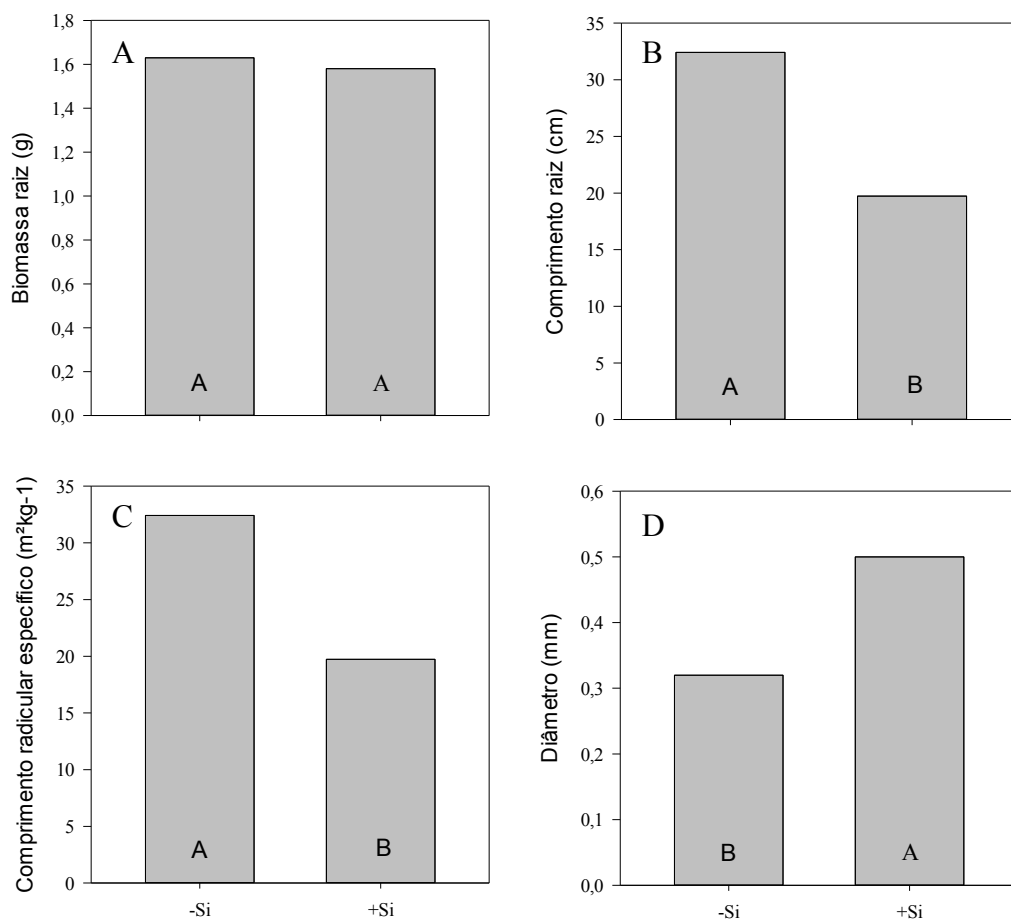


Figura 2. Biomassa (A), comprimento (B), comprimento radicular específico (C), e diâmetro (D) de raízes de arroz fertilizadas sem (-Si) ou com Si (+Si) aos 30 dias após o transplantio ($n = 6 \pm EP$). As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste F, a 5% de probabilidade.

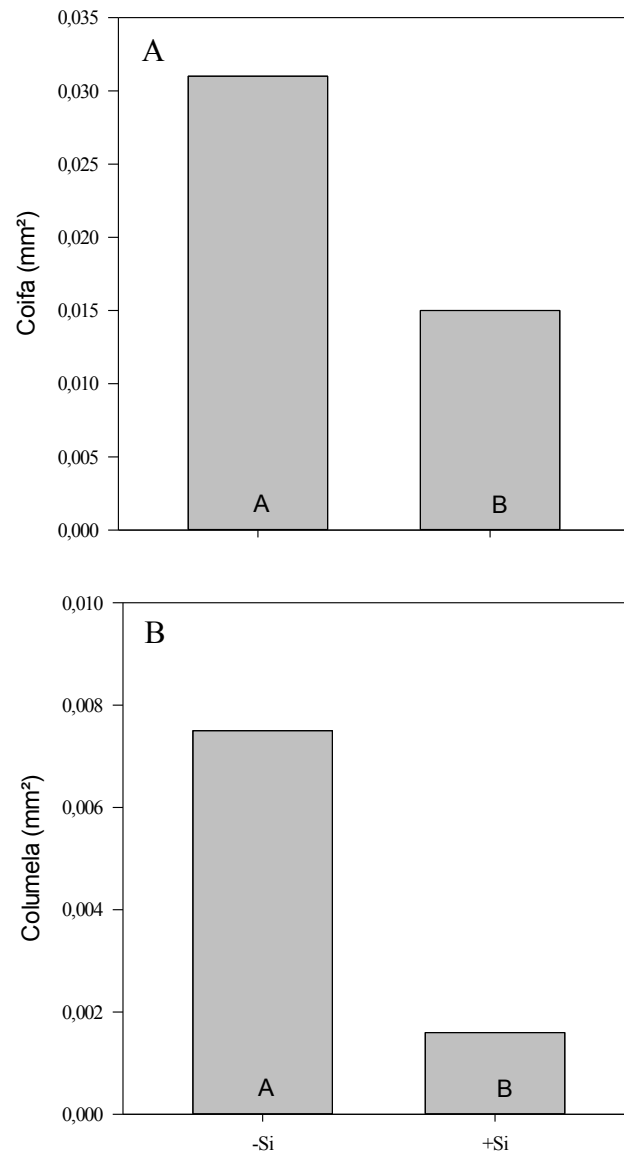


Figura 3. Área da coifa (A) e da columela (B) em raízes de arroz fertilizadas sem (-Si) ou com Si (+Si) aos 30 dias após o transplante ($n = 6 \pm EP$). As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste F, a 5% de probabilidade.

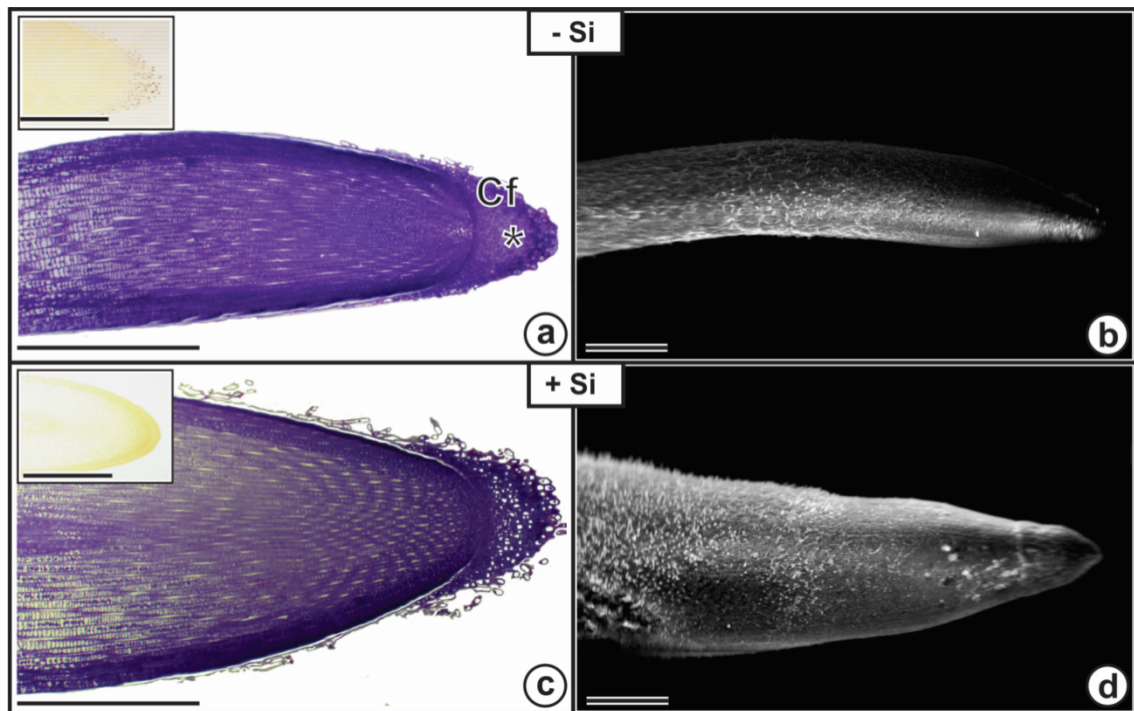


Figura 4. Secções longitudinais (A, C) (barra = 200 μm) e eletromicrografias de varredura (B, D) (barra = 200 μm) raízes de plantas de arroz fertilizadas sem (-Si) (A, B) ou com Si (+Si) (C, D) aos 30 dias após o transplântio. No detalhe da Figura 4 A, C observam-se os resultados do teste histoquímico com lugol, para visualizar a presença de amido. Resultados positivos foram obtidos apenas na região da columela de raízes -Si (pontos pretos).

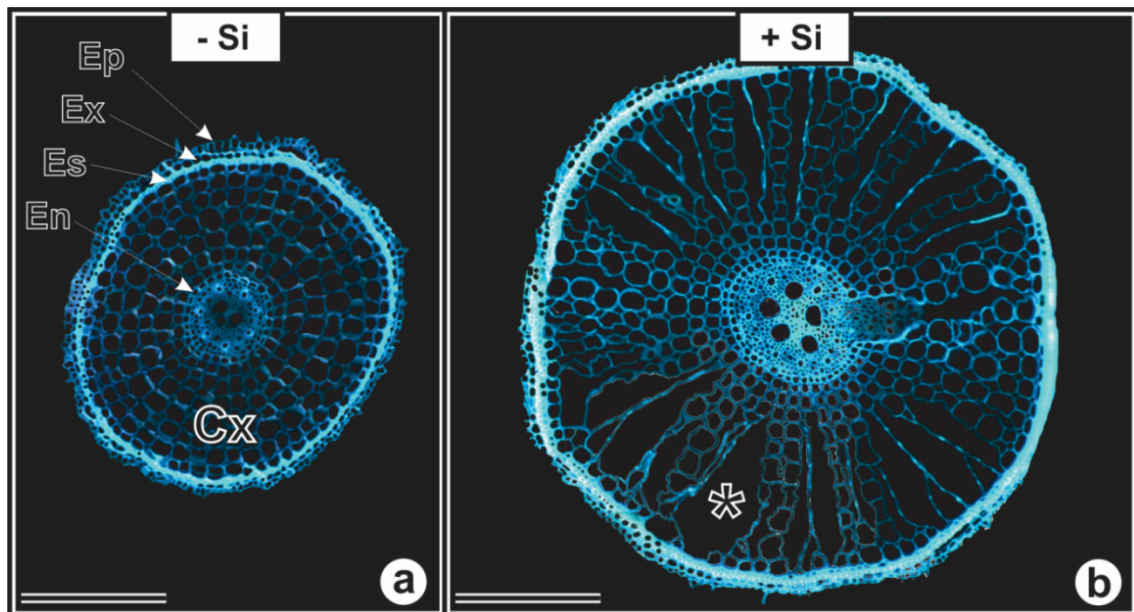


Figura 5. Secções transversais da região radicular distanciada em, aproximadamente, 250 μm da columela, de plantas de arroz cultivadas na ausência (-Si) (A) ou presença (+Si) de silício (Si) (B), aos 30 dias após o transplântio (barra = 200 μm). Legenda: En= endoderme, Cx = córtex; Es= esclerênquima; Ex= exoderme; Ep= epiderme; *= lacunas no parênquima cortical. Fotografias foram obtidas mediante uso de microscópio de fluorescência equipado com filtro para excitação por luz UV (Filtro 1, SPB 365/12).

Tabela 1. Sumário das análises micromorfológicas de secções transversais de raízes de arroz cultivadas na ausência (-Si) ou presença (+Si) de silício (Si) aos 30 dias após o transplante (n = 6 ± EP).

		-Si	+Si
Área (mm ²)	Total	0,400 B	0,772 A
	Vasculatura	0,019 B	0,040 A
	Vasos xilemáticos	0,003 B	0,006 A
	Córtex	0,381 B	0,732 A
	Aerênquima	0,048 B	0,263 A
Área (%)	Vasculatura: Total	4,88 A	5,16 A
	Individual dos vasos xilemáticos	0,09 A	0,12 A
	Aerênquima: Córtex	12,83 B	38,08 A
Espessura (mm)	Endoderme	0,006 B	0,009 A
	Córtex	0,250 B	0,361 A
	Esclerênquima	0,007 A	0,007 A
	Exoderme	0,004 A	0,005 A
	Epiderme	0,009 A	0,009 A
Número	Raízes secundárias	0 B	2 A

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste F, a 5% de probabilidade.

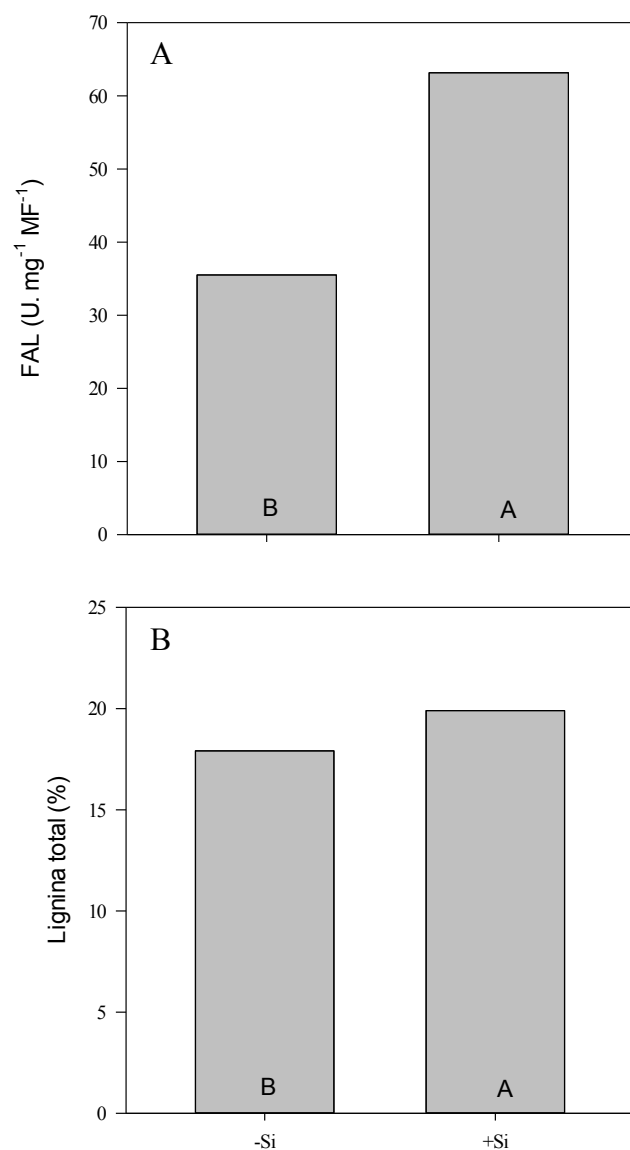


Figura 6. Atividade da fenilalanina amônia liase (FAL) (A) e acúmulo de lignina total (B) em raízes de arroz fertilizadas sem (-Si) e com Si (+Si) aos 30 dias após o transplântio ($n = 6 \pm EP$). As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste F, a 5% de probabilidade.

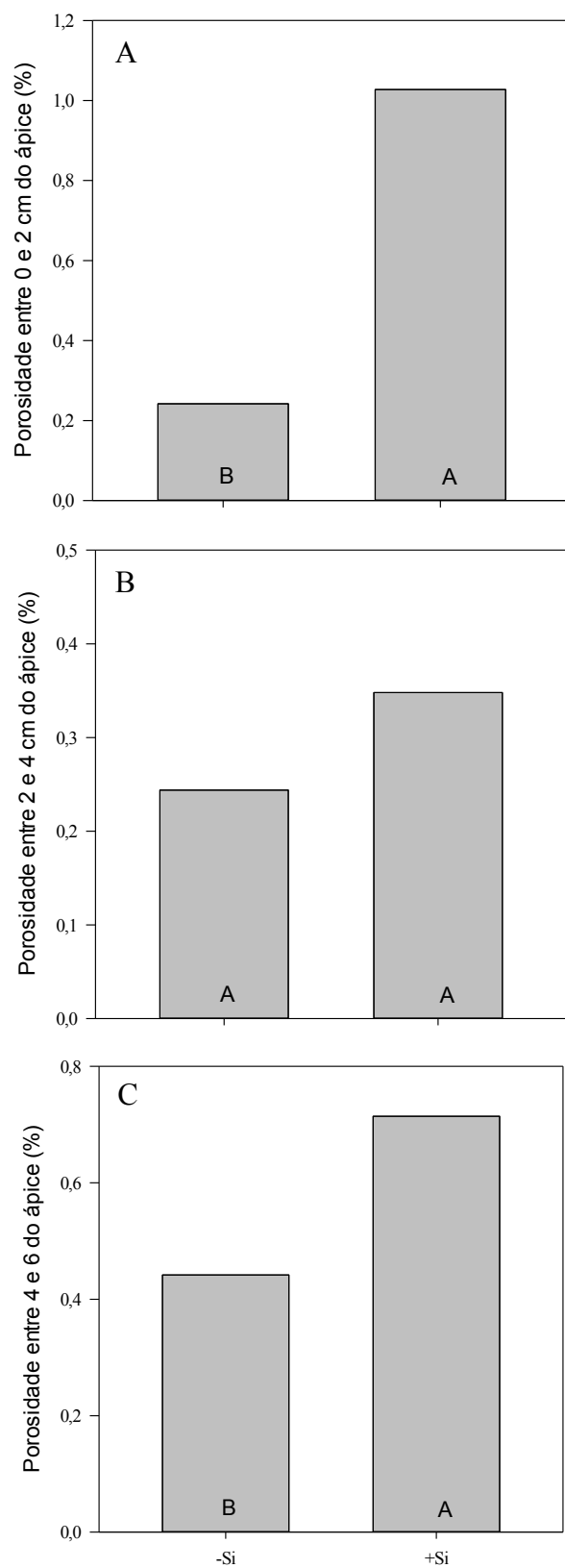


Figura 7. Porosidade em segmentos distanciados entre 0 e 2 cm (A), entre 2 e 4 cm (B), e entre 4 e 6 cm (C) do ápice radicular de plantas de arroz cultivadas na ausência (-Si) ou presença (+Si) de silício (Si) aos 30 dias após o transplante ($n = 6 \pm EP$). As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste F, a 5% de probabilidade.

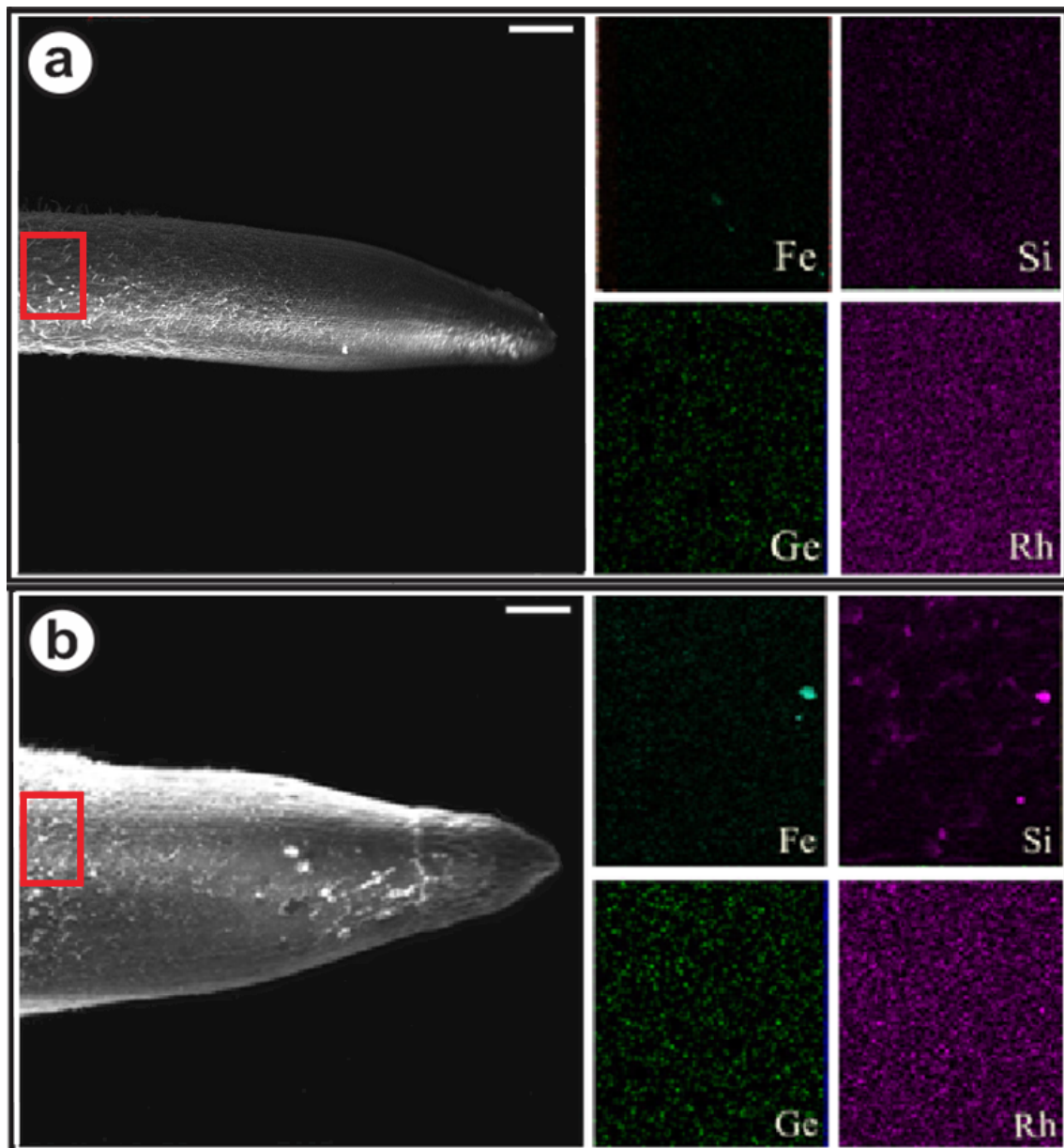


Figura 8. Eletromicrografias de varredura do ápice radicular de plantas fertilizadas sem (-Si) e com Si (+Si) aos 30 dias após o transplante, destacando a região analisada pela sonda de raios-X e localização dos elementos selecionados nos tratamentos -Si (A) e +Si (B) (barra: 200 μm).

Tabela 2. Elementos nutrientes minerais (%) adsorvidos à superfície radicular de plantas fertilizadas sem (-Si) e com Si (+Si) aos 30 dias após o transplantio (n = 6 ± EP).

Elementos Minerais	-Si	+Si	Diferença do tratamento +Si em relação ao -Si (%)
Si	0,35 ± 0,06 B	1,41 ± 0,13 A	305
P	0,94 ± 0,09 A	0,76 ± 0,16 A	-19,3
K	0,38 ± 0,04 A	0,33 ± 0,03 A	-12,4
Ca	0,26 ± 0,02 A	0,15 ± 0,02 B	-42,2
Fe	0,14 ± 0,02 B	0,58 ± 0,24 A	301
Cu	0,67 ± 0,04 A	0,66 ± 0,04 A	-2,40
Mo	3,19 ± 0,23 A	3,56 ± 0,27 A	11,0

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste F, a 5% de probabilidade.

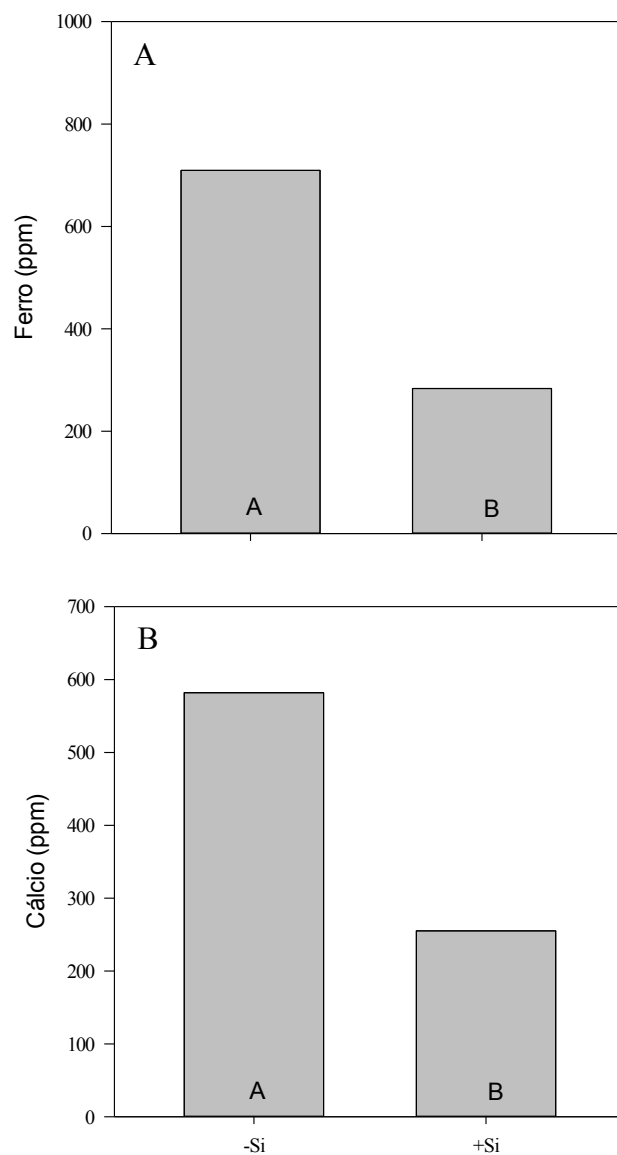


Figura 9. Concentração de ferro (A) e de cálcio (B) solúvel em raiz de plantas de arroz fertilizadas (+Si) ou não com Si (-Si) aos 30 dias após o transplântio ($n = 6 \pm EP$). As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste F, a 5% de probabilidade.

Tabela 3. Efeito da fertilização com Si (0 ou 2 mM, respectivamente, - e +) nos parâmetros cinéticos de Michaelis-Menten [taxa máxima de absorção (V_{\max}), constante de Michaelis-Menten (K_m)] e estimativa da concentração mínima a partir da qual a planta começa a absorver nutrientes da solução (C_{\min}) para a absorção de Si em arroz cv. ‘Oochikara’ aos 45 dias após o transplântio. S1 e S2 correspondem, respectivamente, aos níveis de Si fornecidos em solução antes e após a omissão de tratamento em intervalo de 24 h (*---) ($n = 3 \pm EP$).

Fertilização com Si			Parâmetros cinéticos		
S1		S2	V_{\max} (mmol. g ⁻¹ . h ⁻¹)	K_m (mmol. L ⁻¹)	C_{\min} (mmol. L ⁻¹)
-	*---	-	10,33 ± 2,49 B	0,26 ± 0,07 B	0,01 ± 0,000 C
+	*---	-	10,67 ± 3,56 B	0,34 ± 0,01 B	0,01 ± 0,004 C
-	*---	+	35,33 ± 0,81 A	2,04 ± 0,61 A	0,56 ± 0,017 B
+	*---	+	37,16 ± 0,63 A	2,94 ± 0,63 A	0,80 ± 0,021 A

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste F, a 5% de probabilidade.

CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados apresentados evidenciam que a fertilização com Si é de particular importância especificamente durante a formação da panícula, que ocorre no início do período reprodutivo do ciclo fenológico (R1), enquanto um suprimento desse elemento ao longo do período vegetativo ou em estádios posteriores ao R1 tem efeito marginal ou negligenciável no rendimento de grãos. Registra-se que nenhum estudo anterior descreveu o papel fisiológico do Si durante R1, no controle do rendimento de grãos. Neste trabalho, foi mostrado que a fertilização com Si no estágio R1 fez aumentar o número de grãos por planta e por panícula, sem alterar o número de panículas e tampouco o tamanho da espiguetta. Com efeito, ao longo do ciclo fenológico, mais de 2/3 do Si foram absorvidos durante R1, evidenciando-se, inclusive, que plantas fertilizadas com Si a partir de R1 superexpressaram o gene *Lsi6* possivelmente com a finalidade de aumentar a distribuição de Si para a panícula. O aumento da concentração de Si na panícula durante R1 foi acompanhado de maior tamanho e de antecipação na emissão dessa estrutura reprodutiva, além de um aumento na atividade fotossintética da folha-bandeira para sustentar uma maior exportação de fotoassimilados para os grãos, por aumentar o número efetivo de grãos, resultando, em última análise, em maior porcentagem de grãos cheios.

Além de sua importância no rendimento de grãos de arroz, quando fornecido durante R1, o pequeno percentual de Si retido na raiz, ao que tudo indica, também tem importante papel fisiológico nesse tecido. Neste trabalho, baseados em análises morfoanatômicas e fisiológicas, foi evidenciado que o Si, *per se*, pode agir como um sinal para promover a formação simultânea da barreira contra a perda radial de oxigênio e da placa de Fe, e os efeitos sinérgicos dessas formações impõem mudanças compensatórias na morfologia radicular para conferir uma presumível maior tolerância a estresses, sem afetar a absorção desse elemento. Num futuro próximo, análises de transcriptoma na panícula ainda em formação deverão permitir a identificação genes-candidatos potencialmente regulados em nível genômico global pelo Si. Tais informações, quando relacionadas com o número efetivo de grãos por panícula, permitirão avanços ainda maiores na compreensão dos mecanismos mediados pelo Si que permitem aumentos na produtividade do arroz. Em nível de raiz, as alterações morfoanatômicas e fisiológicas mediadas pelo Si precisam ser mais bem detalhadas tanto em nível metabólico e molecular.