

TALITA OLIVEIRA DE ARAÚJO

EFEITOS DO FERRO EM *Setaria parviflora* (POIR.) KERGUÉLEN E
Paspalum urvillei STEUDEL (POACEAE)

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Botânica, para obtenção do título de
Magister Scientiae.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2012

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

T

A663e
2012

Araújo, Talita Oliveira de, 1986-
Efeitos do ferro em *Setaria parviflora* (Poir.) Kerguélen e
Paspalum urvillei Steudel (Poaceae) / Talita Oliveira de
Araújo. – Viçosa, MG, 2012.
xii, 83f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Luzimar Campos da Silva.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Gramínea. 2. *Setaria parviflora*. 3. *Paspalum urvillei*.
4. Plantas - Efeito do ferro. 5. Plantas - Crescimento. 6. Plantas
- Anatomia. 7. Plantas - Fisiologia. I. Universidade Federal de
Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 584.9

TALITA OLIVEIRA DE ARAÚJO

EFEITOS DO FERRO EM *Setaria parviflora* (POIR.) KERGUÉLEN E
Paspalum urvillei STEUDEL (POACEAE)

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Botânica, para obtenção do título de
Magister Scientiae.

APROVADA: 02 de abril de 2012.

Eduardo Gusmão Pereira

Cleberson Ribeiro

Aristéa Alves Azevedo
(Coorientadora)

Kacilda Naomi Kuki
(Coorientadora)

Luzimar Campos da Silva
(Orientadora)

**Aos meus pais, Marcos Antônio Oliveira de
Araújo e Fátima Oliveira de Araújo, pelo amor e apoio.**

Dedico.

AGRADECIMENTOS

À Deus por está sempre presente guiando meus passos.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV), através do Departamento de Botânica, pela oportunidade de crescimento profissional e a CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

À professora Luzimar Campos da Silva, que sempre foi muito mais do que uma orientadora. Obrigada por está sempre presente, por sua amizade e confiança. Graças a você pude amadurecer muito nesses dois anos, espero que nossa parceria dure muito mais.

À Professora Aristéia Alves Azevedo, pelos ensinamentos, sugestões e críticas na dissertação.

À Professora Kacilda Naomi Kuki, pela ajuda na elaboração do experimento, orientações, sugestões e paciência.

Ao Professor Eduardo Gusmão Pereira, pela disponibilidade em ajudar desde a elaboração do experimento a análise dos dados. Agradeço imensamente pelas contribuições e críticas.

À todos os demais professores do Programa, pelos ensinamentos e vivências.

À minha família pelo amor, apoio e compreensão da minha ausência.

À Pollyanna Ferreira pela amizade, apoio, companheirismo. Muito obrigada por tudo.

Aos melhores estagiários do mundo, Talles Bruno Oliveira, Brenda Santana e Guilherme Carvalho pelos momentos de descontração e muito trabalho, porque trabalho pouco é bobagem!! Vocês foram fundamentais nessa etapa da minha vida, esta conquista também é de vocês.

À Nívea Moreira e Larisse de Freitas pelo apoio técnico na execução do trabalho.

À Larisse de Freitas (Laris) minha amiga, dupla, confidente, família. Sem ela tudo seria muito mais difícil e sem graça nenhuma. E que esse seja o “primeiro” trabalho de muitos que faremos juntas.

À Franklin Magnum pela amizade, companheirismo, paciência e por está sempre perto nos momentos difíceis.

À Wellington Carvalho (Pezovisky) pela amizade e momentos de descontração sempre muito prazerosos.

À Jaqueline Martins (Jacks) e Nívea Moreira (Nivão) pela amizade, companheirismo e incentivo.

À Naiara Campos (Nai), Tiago Augusto (Tica) e Dya por todos os ensinamentos, conselhos e ajuda em todos os momentos. Muito obrigada por tudo!!

À Bruno Sant’Anna Santos (Bubu) pela amizade, incentivo e jantares maravilhosos.

Aos amigos do laboratório de anatomia vegetal, que sempre tiveram muito carinho por mim e disposição em ajudar.

Às técnicas do laboratório de anatomia vegetal Aurora Sato e Patrícia Fonseca, pela paciência e ajuda.

Ao Rogério Gomide e ao João Bosco pela ajuda incondicional durante a montagem e condução dos experimentos.

Aos companheiros, também sem vida social, da UCP: Samuel, Jimmy, Robson, Tais, Mariana, Alyne.

A todos os funcionários do Programa de Pós-graduação em Botânica e do Departamento de Biologia Vegetal da UFV, em especial, ao Ângelo.

Obrigada a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, vocês fazem diferença em minha vida!

BIOGRAFIA

Talita Oliveira de Araújo, filha de Josefa de Fátima Oliveira de Araújo e Marcos Antônio Alves de Araújo, nasceu em Recife, PE, em 03 de setembro de 1986. Em junho de 2009, graduou-se em Bacharelado em Ciências Biológicas pela Universidade Federal Rural de Pernambuco.

Em março de 2010, iniciou o Mestrado em Botânica, pelo Departamento de Biologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa, concluindo o curso com a defesa da dissertação intitulada “Efeitos do ferro em duas espécies de gramíneas”, em abril de 2012.

SUMÁRIO

RESUMO	viii
ABSTRACT.....	x
1.INTRODUÇÃO GERAL	1
2,OBJETIVOS GERAIS	5
3.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	6
CAPÍTULO 1: Efeitos do acúmulo de ferro na composição mineral e no crescimento de duas espécies de gramíneas	
Resumo.....	11
Introdução	13
Material e Métodos.....	15
Resultados.....	18
Discussão.....	21
Referências Bibliográficas.....	24
Tabelas.....	29
CAPÍTULO 2: Influência do excesso de ferro na morfologia e anatomia de <i>Setaria parviflora</i> (Poir.) Kerguelen e <i>Paspalum urvillei</i> Steudel (Poaceae)	
Resumo	35
Introdução	37
Material e Métodos.....	39
Resultados.....	42
Discussão.....	46
Referências Bibliográficas.....	49
Figuras e Tabelas.....	53
CAPÍTULO 3: Alterações fisiológicas causadas pelo excesso de ferro em duas espécies de gramíneas	
Resumo	62

Introdução	63
Material e Métodos.....	64
Resultados.....	67
Discussão.....	69
Referências Bibliográficas.....	72
Figuras e Tabelas.....	77
4.CONCLUSÕES GERAIS.....	83

RESUMO

ARAÚJO, Talita Oliveira de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, abril de 2012. **Efeitos do ferro em *Setaria parviflora* (Poir.) Kerguélen e *Paspalum urvillei* Steudel (Poaceae).** Orientadora: Luzimar Campos da Silva. Coorientadores: Aristéa Alves Azevedo e Kacilda Naomi Kuki.

Na localidade de Ubu, litoral do Espírito Santo, a restinga vem sendo impactada pela presença de uma usina de pelotização de ferro que prepara o minério para exportação. Uma considerável quantidade de minério de ferro em pó e outros dejetos se depositam em corpos d'água utilizados nas unidades de pelotização. É comum encontrar espécies vegetais, dentre elas as gramíneas *Setaria parviflora* (Poir.) Kerguélen e *Paspalum urvillei* Steudel se desenvolvendo nesta situação. O presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos causados pelo ferro em duas espécies de gramíneas, caracterizando possíveis alterações anatômicas e respostas fisiológicas. Mudas de *S. parviflora* e *P. urvillei* foram cultivadas em solução nutritiva de Hoagland, a meia força iônica em pH 5,0, com constante aeração. As plantas foram submetidas, gradativamente, às diferentes concentrações de Fe^{3+} na solução nutritiva, na forma Fe-EDTA (0,009; 1; 2; 4 e 7 mM). Após a aclimação, as plantas permaneceram expostas aos tratamentos por 17 dias para as análises do acúmulo de ferro, da composição mineral e das variáveis anatômicas e por 20 dias para as análises dos parâmetros fisiológicos. Foram realizadas avaliações de crescimento, trocas gasosas, fluorescência da clorofila *a*, permeabilidade de membrana, quantificação de pigmentos, caracterização morfológica, caracterização anatômica (em microscopia de luz, histoquímica para ferro e análise micromorfométrica), quantificação de ferro e outros nutrientes no material vegetal e nas soluções nutritivas. Foram ainda calculados o fator de translocação (FT) e fator de bioconcentração (FBC). Os dados foram submetidos à análise de variância, e as médias, comparadas pelo teste de Tukey, a 5%. O maior teor de Fe presente na placa foi encontrado na concentração 7 mM de Fe-EDTA para ambas as espécies. A concentração dos nutrientes Fe, Mn, Zn, P, K, Ca e Mg na placa de ferro diferiram em relação aos tratamentos. As espécies acumularam mais ferro na raiz do que na parte aérea. As espécies apresentaram comportamento semelhante em relação às doses de ferro nas raízes, porém na parte aérea, *P. urvillei* acumulou mais ferro na concentração 7 mM de Fe-EDTA do que *S. parviflora*. O

excesso de ferro alterou significativamente o teor de Fe, Cu, K e Mg nas raízes e Fe, Mn, Zn, N, P, K, Ca e Mg na parte aérea. Entre os parâmetros de crescimento avaliados, o peso da matéria seca da parte aérea e da raiz, o número de folhas e o volume das raízes apresentaram aumento significativo em relação ao excesso de ferro. Os sintomas visuais nas folhas apareceram de forma mais discreta em *S. parviflora* em relação aos observados em *P. urvillei*. Nas raízes das espécies foram observados, com o aumento da concentração de ferro, coloração amarelada das raízes e aspecto mucilaginoso. *P. urvillei* e *S. parviflora* apresentaram alterações anatômicas semelhantes. Foram visualizadas, nas folhas, alterações no formato das células da epiderme, do mesofilo e da bainha do feixe vascular, retração do protoplasto e alterações no formato das células do metaxilema. Nas raízes, foi observado retração do protoplasto, formação de tecido de cicatrização e colapso das células do córtex, alteração no formato das células da endoderme, do protoxilema, do metaxilema, do floema e colapso das células do cilindro vascular. Em relação à histoquímica para o ferro, com 48h de exposição ao reagente, as folhas de *S. parviflora* exibiram reação mais forte (alta intensidade de coloração azul) do que as folhas de *P. urvillei*. Foi observada redução significativa entre os tratamentos de Fe-EDTA nos valores de epiderme da face abaxial e da bainha do feixe vascular nas duas espécies estudadas. Houve aumento significativo no teor de clorofila *a* e carotenóides nas concentrações intermediárias de ferro nas espécies estudadas. *P. urvillei* apresentou menores valores de A , F_0 , F_v/F_m e maior extravasamento de eletrólitos na concentração 7 mM de Fe-EDTA em comparação com *S. parviflora*. Além disso, *S. parviflora* apresentou maior eficiência na dissipação energética do tipo não-fotoquímica (NPQ). Conclui-se que *S. parviflora* e *P. urvillei* são espécies indicadas para utilização em áreas impactadas pelo excesso de ferro como fitoextratoras. *P. urvillei* acumulou mais ferro na parte aérea mostrando danos visuais e anatômicos mais intensos em relação a *S. parviflora*. Porém, analisando os danos fisiológicos, *S. parviflora* mostrou-se ser mais sensível do que *P. urvillei* quando submetidas ao estresse causado pelo excesso de ferro.

ABSTRACT

ARAÚJO, Talita Oliveira de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, April, 2012. **Effects of iron in *Setaria parviflora* (Poir.) Kerguelen and *Paspalum urvillei* Steudel (Poaceae).** Adviser: Luzimar Campos da Silva. Co-Advisers: Aristéa Alves Azevedo and Kacilda Naomi Kuki.

In Ubu, coast of Espírito Santo, the restinga have been impacted by the presence of an iron pellet factory that prepares the ore for exporting. Considerable amount of iron ore powder and other wastes are deposited in water bodies used in pelletizing plants. It is common to find plant species, among them the grasses *Setaria parviflora* (Poir.) Kerguelen and *Paspalum urvillei* Steudel developing in this situation. This study aimed to evaluate the effects caused by iron in two grass species, characterizing possible anatomical changes and physiological responses. Seedlings of *S. parviflora* and *P. urvillei* were grown in Hoagland nutrient solution, at half ionic strength and 5.0 pH, with aeration constant. The plants were treated gradually with different concentrations of Fe^{3+} in the nutrient solution, in the form Fe-EDTA (0.009, 1, 2, 4 and 7 mM). After acclimatization, the plants remained exposed to treatments for 17 days for the analysis of iron accumulation, mineral composition and anatomical variables, and 20 days for analysis of physiological parameters. We evaluated growth, gas exchange, chlorophyll fluorescence, membrane permeability, pigments quantification, morphological, anatomical characterization (light microscopy, histochemical for iron and micromorphometric analysis), iron quantification and other nutrients in plant material and the nutrient solution. We also calculated the translocation factor (TF) and bioconcentration factor (BCF). The data were submitted to ANOVA and the means were compared by Tukey test at 5%. The greatest amount of Fe present on the board was found in concentration 7 mM Fe-EDTA concentration for both species. The concentration of nutrients Fe, Mn, Zn, P, K, Ca and Mg in the iron plate differs in regard to the treatment. The species accumulated more iron in roots than in shoots. The species showed similar behavior related to iron levels in the roots, but in the shoot, *P. urvillei* accumulated more iron in the 7 mM Fe-EDTA concentration than *S. parviflora*. Iron excess has significantly changed the content of Fe, Cu, K and Mg in the roots and Fe, Mn, Zn, N, P, K, Ca and Mg in the shoot. Among the growth parameters, the dry weight

of shoot and root, leaves number and root volume increased significantly related to iron excess. Visual symptoms in the leaves appeared more discretely in *S. parviflora* than those observed in *P. urvillei*. In roots of these species it was observed, with increasing iron concentration, yellowish appearance of roots and mucilage. *P. urvillei* and *S. parviflora* had similar anatomical abnormalities. On the leaves, it was visualized changes in cell shape of epidermis, mesophyll and vascular bundle sheath, protoplast shrinkage and changes in cell shape of metaxylem. In roots, it was observed protoplast shrinkage, scar tissue formation and cortical cells collapse, changes in the cell shape of endoderm, protoxylem, metaxylem, phloem, and collapse of vascular cylinder cells. In relation to histochemical for iron, after 48 hours of exposure to the reactant, the leaves of *S. parviflora* exhibited stronger reaction (high blue staining intensity) than the leaves of *P. urvillei*. Significant reduction was observed among the Fe-EDTA treatments in the values of the abaxial epidermis and vascular bundle sheath on both species. There was a significant increase in the concentration of chlorophyll *a* and carotenoids in iron concentrations on the intermediate species. *P. urvillei* showed lower values for A , F_0 , F_v/F_m and increased electrolyte leakage at 7 mM Fe-EDTA concentration compared to *S. parviflora*. Furthermore, *S. parviflora* was more efficient in energy dissipation of the non-photochemical quenching (NPQ). We conclude that *S. parviflora* and *P. urvillei* species are indicated for use in areas affected by iron excess as phytoextractors. *P. urvillei* accumulated more iron in the shoot showing more intense visual and anatomic damage when compared to *S. parviflora*. However, analyzing the physiological damage, *S. parviflora* proved to be more sensitive than *P. urvillei* when subjected to stress caused by iron excess.

1. INTRODUÇÃO GERAL

O ferro, elemento essencial aos vegetais, participa de diversas funções importantes do seu metabolismo (Jeong e Guerinot, 2009; Hänsch e Mendel, 2009). Apesar de abundante na crosta terrestre, o ferro apresenta-se pouco solúvel em condições aeróbicas, sendo, principalmente, encontrado como oxidratos, resultando em baixa disponibilidade para as plantas. Os vegetais apresentam estratégias que permitem a absorção desse elemento. A estratégia utilizada por gramíneas inclui a síntese e liberação na rizosfera de quelantes fortes chamados fitossideróforos (PS) que se ligam ao Fe^{3+} . Transportadores específicos presentes nas células radiculares são responsáveis pela absorção do complexo Fe^{3+} -PS (Schmidt, 1999; Hell e Stephan, 2003; Kim e Guerinot, 2007; Morrissey e Guerinot, 2009; Conte e Walker, 2011; Nozoye et al., 2011).

Por se tratar de elemento com elevada densidade ($7,8 \text{ g cm}^{-3}$), o ferro é considerado um metal pesado. Como tal, quando encontrado em grandes quantidades no meio ambiente pode causar toxicidade às plantas (Williams et al., 2000; Ducic e Polle, 2005). Devido à grande demanda de produtos fabricados com esse metal, as indústrias de minério expandem suas atividades, podendo ocasionar desequilíbrio ecológico e riscos à saúde humana (Istratov et al., 2000; Kuki et al., 2008a).

No Brasil, ocorrem problemas relativos à contaminação ambiental envolvendo a exploração de ferro. Esse país está em quinto lugar entre os países possuidores das maiores quantidades de minério de ferro, apresentando 7,1% das reservas mundiais (Araujo et al., 2008). Na região Sudeste, frequentemente, ocorre contaminação da água pelo ferro (Cordeiro, 2002) e diversos ecossistemas ficam expostos a elevadas concentrações de ferro. Dentre eles, a restinga, que apresenta vegetação com diversidade estrutural acentuada (Freire, 1990; Rocha et al., 2003). No Espírito Santo, esse ecossistema vem sendo impactado pela emissão de ferro particulado, dentre outros poluentes, devido à presença de usinas mineradoras que representam risco à vegetação (Silva et al., 2006; Silva e Azevedo, 2007; Oliveira et al., 2007; Kuki et al., 2009). Em Ubu (ES), está em funcionamento uma usina de pelletização de ferro que prepara o minério para exportação. Faz parte do complexo industrial uma lagoa de decantação, onde é despejada a maior parte da água utilizada nas unidades de pelletização. Uma considerável quantidade de resíduos contendo minério de ferro em pó e outros dejetos

são depositados neste corpo d'água. É comum encontrar, nesses ambientes, uma variedade de espécies vegetais, dentre elas as gramíneas *Setaria parviflora* (Poir.) Kerguelen e *Paspalum urvillei* Steudel, se desenvolvendo nesta situação.

As plantas que se desenvolvem em ambientes contaminados por metais podem desenvolver diferentes tipos de estratégias que permitem sua sobrevivência: Evitar a absorção do metal tóxico; evitar a translocação dele para a parte aérea; acumular o metal em seus tecidos aéreos ou acumular na parte aérea concentrações de metais maiores do que os presentes no solo, sendo, assim, denominadas hiperacumuladoras (Memon et al., 2001; Rascio e Navari-Izzo, 2011). Plantas hiperacumuladoras podem ser utilizadas na fitorremediação de ambientes impactados por poluentes, sendo uma técnica eficiente e de baixo custo (Borges e Barroso et al 1997; Pires et al., 2003; Sgherri et al., 2003; Pilon-Smits, 2005; Coutinho e Barbosa, 2007; Carneiro e Gariglio, 2010). A fitoextração tem sido aplicada com eficiência em diversas partes do mundo (Greger et al., 2003; Jadia e Fulekar, 2008). Essa técnica consiste no uso de plantas hiperacumuladoras, em que, posteriormente, a biomassa aérea é retirada e uma fração da concentração do metal é removida do solo (Lasat, 2002).

Segundo Rascio e Navari-Izzo (2011), dentre as angiospermas, menos de 0,2% das espécies são conhecidas por apresentarem capacidade de tolerar elevados níveis de metais pesados e acumulá-los em altas concentrações nos tecidos. O potencial para a fitoextração depende da interação entre o solo, o metal e a planta (Lasat, 2002) e, no Brasil, as pesquisas nessa área ainda são escassas (Pereira, 2005).

Nos vegetais, o nível crítico de toxicidade de ferro é aproximadamente 500 mg Fe/Kg de matéria seca (Marschner, 1995). Vários trabalhos têm sido realizados a fim de identificar os sintomas de toxidez por ferro em diferentes espécies vegetais (Sahrawat, 2000; Audebert e Sahrawat, 2000; Olaleye et al., 2001; Silva et al., 2006; Oliveira et al., 2007; Kuki et al., 2008 a-b, 2009; Ravet et al., 2009, Siqueira-Silva et al, 2011). Esses sintomas de toxidez podem ser de dois tipos: a toxidez direta causada pelo acúmulo de elevados níveis de ferro nos tecidos vegetais (Olaleye et al., 2001; Silveira et al., 2007); e a toxidez indireta causada pela desordem nutricional múltipla, resultante da deposição do ferro em forma de placa nas raízes (Otton et al., 1982; Yamauchi, 1989).

Na célula, o Fe^{2+} livre é tóxico devido a sua capacidade de catalizar a decomposição de H_2O_2 ao radical hidroxila ($\bullet\text{OH}$), que é extremamente reativo e pode causar danos ao DNA, oxidar lipídios e proteínas. A toxidez direta gera aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) que causam estresse oxidativo à célula, o que resulta em danos aos tecidos das plantas (Becana et al., 1998; Tsai e Huang, 2006). As EROS estão associadas a vários distúrbios fisiológicos nas plantas, as quais possuem mecanismos que minimizam esses efeitos tóxicos, pela ação de moléculas e enzimas antioxidativas (Meharg, 1994; Schützendübel e Polle, 2002). Metabólicos secundários produzidos pelas plantas podem atuar como moléculas antioxidantes que tendem a quelar metais pesados. Dentre estes metabólitos, destacam-se os compostos fenólicos cujo acúmulo nos tecidos está relacionado às altas concentrações de metais e da produção de EROS (Winkel-Shirley, 2002; Jung et al., 2003; Michalak, 2006).

A toxidez indireta é causada pela formação da placa de ferro, em que ocorre a precipitação do ferro sobre a superfície de raízes de algumas espécies vegetais expostas a altas concentrações deste metal (Liu et al., 2007, 2008). A composição da placa de ferro é similar aos óxidos de ferro presentes no solo e é capaz de adsorver nutrientes. Portanto, essa placa altera a absorção de elementos essenciais, causando distúrbios nutricionais (Howeler, 1973; Zhang et al., 1999), e a absorção de outros metais pesados (Deng et al., 2010). Siqueira-Silva et al. (2011) estudaram o efeito da placa de ferro no teor de nutrientes em duas espécies da restinga. Esses autores observaram elevação na concentração de zinco nas raízes de *Canavalia rosea* DC. e diminuição de nitrogênio nas folhas de *Ipomea pes-caprae* L na presença da placa de ferro.

A toxidez severa do ferro pode causar danos aos complexos fotossintéticos reduzindo a eficiência quântica do PSII e a taxa de transporte de elétrons, aumentando a dissipação não fotoquímica do excesso de energia (Suh et al., 2002; Pereira, 2009; Castro, 2010). Essas respostas, somadas à degradação dos pigmentos fotossintéticos, ocasionam redução na taxa de assimilação líquida de CO_2 e, conseqüentemente, perda da capacidade de fixação de CO_2 nos cloroplastos (Terry, 1980; Mishra e Dubey, 2005).

Nas folhas, o brozeamento foliar é o sintoma visual típico associado ao dano induzido pelo excesso de ferro aos componentes celulares e aos processos fisiológicos.

Nas raízes, observa-se diminuição no crescimento, flacidez, ausência de ramificação, aspecto mucilaginoso e mudança na coloração (Becker e Asch, 2005; Castro, 2010).

Algumas espécies são capazes de acumular grandes quantidades de poluentes sem apresentar injúrias visuais (Arndt *et al.* 1995). Por isso, as análises microscópicas são importantes, pois podem auxiliar no diagnóstico precoce da injúria antes do surgimento de sintomas visíveis, além de auxiliar no esclarecimento dos mecanismos de fitotoxicidade (Silva *et al.*, 2000; Sant'Anna-Santos *et al.*, 2006; Sant'Anna-Santos *et al.*, 2007; Sant'Anna-Santos e Azevedo, 2007).

Dependendo da concentração do ferro e da sensibilidade da espécie, algumas alterações anatômicas podem ser observadas, entre elas mudanças na divisão das células do meristema apical radicular, alterações nas células do córtex, retração do protoplasto, formação de tecido de cicatrização e alteração no tamanho das células. No cilindro vascular, podem ocorrer mudanças na divisão e no padrão de diferenciação das células do periciclo e incompleta diferenciação do metaxilema (Siqueira-Silva *et al.*, 2011).

A histolocalização do ferro, constitui uma ferramenta importante em trabalhos anatômicos, visto que evidencia os principais sítios de acúmulo deste elemento nos tecidos e a partir dos resultados obtidos é possível inferir sobre danos secundários. Por isso, essa técnica tem sido utilizada por vários autores (Silva *et al.*, 2006; Silva e Azevedo, 2007; Carli, 2008; Mendes, 2008; Siqueira-Silva *et al.*, 2011).

As espécies *Setaria parviflora* e *Paspalum urvillei* encontradas na lagoa de decantação da usina de pelotização de ferro em Ubu (ES) se desenvolvem em ambiente com excesso de ferro e podem apresentar tolerância a esse metal. Essas espécies possuem ampla distribuição geográfica e, portanto, estão adaptadas a diferentes ambientes. Estas características são favoráveis iniciais na escolha de espécies a serem utilizadas em projetos de recuperação de áreas impactadas por usinas de minério de ferro. Nesse trabalho, a hipótese estudada foi que essas espécies podem tolerar altas concentrações de ferro, ajustando suas características morfológicas, anatômicas e fotossintéticas, podendo hiperacumular ferro em suas partes aéreas e atuar como fitoextratoras de ferro em ambientes contaminados por esse metal.

2. OBJETIVO GERAL

Verificar as respostas morfofisiológicas de duas espécies de gramíneas a diferentes concentrações de ferro.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a influência de diferentes concentrações de ferro sobre o crescimento, a composição mineral e o acúmulo de ferro em duas espécies de gramíneas.
- Caracterizar morfológicamente e anatomicamente plantas desenvolvidas em níveis tóxicos de ferro.
- Analisar o comportamento das variáveis fisiológicas em resposta ao ferro nas espécies *Setaria parviflora* (Poir.) Kerguélen e *Paspalum urvillei* Steudel (Poaceae).

3. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- Araujo, D.M.; Yoshida, M.I.; Carvalho, C.F.; Stapelfeldt, F. (2008) Reciclagem de aminas na flotação de minério de ferro. *REM: Escola de Minas*, 61: 455-460.
- Arndt, U.; Flores, F.; Weinstein, L. (1995) *Efeitos do flúor sobre as plantas: diagnose de danos na vegetação do Brasil*. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Audebert, A.; Sahrawat, K.L. (2000) Mechanisms for iron toxicity tolerance in lowland rice. *Journal of Plant Nutrition*, 23: 1877-1885.
- Becana, M.; Moran, J.F.; Iturbe-Ormaetxe, I. (1998) Iron-dependent oxygen free radical generation in plants subjected to environmental stress: toxicity and antioxidant protection. *Plant and Soil*, 201: 137-147.
- Becker, M.; Asch, F. (2005) Iron toxicity in rice conditions and management concepts. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 168: 558-573.
- Borges, A.F.; Barroso, E.V. (1997) Análise da utilização de geofísica e biorremediação em problemas de contaminação de solo e água subterrânea. *Anuário do Instituto de Geociência*, 20: 107-142.
- Carli, V. G. *Avaliações fisiológicas, bioquímicas e hitoquímica de Ipomoea pescaprae cultivadas em diferentes concentrações de ferro*. Viçosa, MG: UFV, 2008. 46 p. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Universidade Federal de Viçosa, 2008.
- Carneiro, D.A.; Gariglio, L.P. (2010) A biorremediação como ferramenta para a descontaminação de ambientes terrestres e aquáticos. *Revista Tecer*, 3: 82-95.
- Castro, L.N. (2010) *Avaliação ecofisiológicas do impacto causado pelo areosol marinho e pela deposição de ferro particulado em Eugenia uniflora L. (Myrtaceae)*. Dissertação de mestrado: Universidade Federal de Viçosa. 58p.
- Conte, S.S.; Walker, E.L. (2011) Transporters contributing to iron trafficking in plants. *Molecular Plant*, 4: 464-476.
- Cordeiro, E.A. (2002) *Influência do tratamento de água ferruginosa no desempenho de sistema de irrigação por gotejamento*. Dissertação de mestrado: Universidade Federal de Lavras, 92 p.
- Coutinho, H.D.; Barbosa, A.R. (2007) Fitorremediação: Considerações Gerais e Características de Utilização. *Silva Lusitana*, 15: 103 – 117.
- Deng, D.; Wu, S.; Wu, F.; Deng, H.; Wong, M. (2010) Effects of root anatomy and Fe plaque on arsenic uptake by rice seedlings grown in solution culture. *Environmental Pollution*, 158: 2589-2595.

Ducic, T; Polle, A. (2005) Transport and detoxification of manganese and copper in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 17: 103-112.

Freire, M.S.B. (1990) Levantamento florístico do Parque Estadual das Dunas de Natal. *Acta Botanica Brasilica*, 4: 41-59.

Greger, M.; Lanberg, T.; Berg, B. (2003) Efficient phytoextraction of metal by *Salix* in field influence of biomass and removal of leaf litter. *Workshop Phytoremediation of toxic metals*. Stockholm, Sweden, 2p.

Hänsch, R; Mendel, R.R. (2009) Physiological functions of mineral micronutrients (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Mo, B, Cl). *Current Opinion in Plant Biology*, 12: 259–266.

Hell, R.; Stephan, U.W. (2003) Iron uptake, trafficking and homeostasis in plants. *Planta*, 216: 541–551.

Howeler, R.H. (1973) Iron-induced orange disease of rice in relation to physicochemical change in a flooded oxisol. *Proceedings of the Soil Science Society of America*, 37: 898-903.

Istratov, A.A.; Hieslmair, H.; Weber, E.R. (2000) Iron contamination in silicon technology. *Applied Physics A*, 70: 489–534.

Jadia, C.D.; Fulekar, M.H. (2008) Phytotoxicity and remediation of heavy metal by fibrous root grass (sorghm). *Journal of Applied Biosciences*, 10: 491-499.

Jeong, J., Guerinot, M.L. (2009) Homing in on iron homeostasis in plants. *Trends Plant Science*, 14: 280–285.

Jung, C.; Maeder, V.; Funk, F.; Frey, B.; Sticher, H.; Frossard, E. (2003) Release of phenols from *Lupinus albus* L. roots exposed to Cu and their possible role in Cu detoxification. *Plant and Soil*, 252: 301–312.

Kim, S.A.; Guerinot, M.L. (2007) Mining iron: Iron uptake and transport in plants. *FEBS Letters*, 581: 2273–2280.

Kuki, K.N.; Oliva, M.A.; Pereira, E.G. (2008a) Iron ore industry emissions as a potential ecological risk factor for tropical coastal vegetation. *Environmental Management*, 42: 111-121.

Kuki, K.N.; Oliva, M.O.; Pereira, E.G.; Costa, A.C.; Cambraia, J. (2008b) Effects of simulated deposition of acid mist and iron ore particulate matter on photosynthesis and the generation of oxidative stress in *Schinus terebinthifolius* Raddi and *Sophora tomentosa* L. *Science of The Total Environment*, 403: 207-214.

Kuki, K.N.; Oliva, M.A.; Costa, A.C. (2009) The simulated effects of iron dust and acidity during the early stages of establishment of two coastal plant species. *Water, Air and Soil Pollution*, 196: 287-295.

Lasat, M.M. (2002) Phytoextraction of toxic metals: A review of biological mechanisms. *Journal of Environmental Quality*, 31:109–120.

Liu, H.; Zhang, J.; Christie, P.; Zhang, F. (2008) Influence of iron plaque on uptake and accumulation of Cd by rice (*Oryza sativa* L.) seedlings grown in soil. *Science of the Total Environment*, 394: 361-368.

Liu, H.J.; Zhang, J.L.; Zhang, F.S. (2007) Role of iron plaque in Cd uptake by and translocation within rice (*Oryza sativa* L.) seedlings grown in solution culture. *Environmental and Experimental Botany*, 59: 314-320.

Marschner, H. (1995) *Mineral nutrition of higher plant*. 2.ed. New York: Academic Press. 889p

Meharg A.A. (1994) Integrated tolerance mechanisms-constitutive and adaptive plant-responses to elevated metal concentrations in the environment. *Plant Cell and Environment*, 17: 989-993.

Memon, A.; Aktoprakligil, D.; Özdemir, A.; Vertii, A. (2001) Heavy metal accumulation and detoxifikation mechanisms in plants. *Turkish Journal of Botany*, 25: 111-121.

Mendes, P.L.A. (2008) *Absorção, transporte e acúmulo de ferro em tecidos vegetais - histoquímica e fundamentos*. Monografia: Universidade Federal de Viçosa. 37p.

Michalak, A. (2006) Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress. *Polish Journal of Environmental Studies*, 15: 523-530.

Mishra, S.; Dubey, R.S. (2005) Heavy metal toxicity induced alterations in photosynthetic metabolism in plants. Cap. 45. In: Pessarakli. M. (ed) *Handbook of Photosynthesis*. 2 ed. 862 p.

Morrissey, J.; Guerinot, M.L. (2009) Iron Uptake and Transport in Plants: The Good, the Bad, and the Ionome. *Chemical reviews*, 109: 4553–4567.

Nozoye, N.; Nagasaka, S.; Kobayashi, T.; Takahashi, M.; Sato, Y.; Sato, Y.; Uozumi, N.; Nakanishi, H.; Nishizawa, N.K. (2011) Phytosiderophore efflux transporters are crucial for iron acquisition in graminaceous plants. *The Journal of Biological Chemistry*, 286: 5446–5454.

Olaleye, A.O.; Tabi, F.O.; Ogunkunle, A.O.; Singh, B.N.; Sahrawat, K.L. (2001) Effect of toxic iron concentration on the growth of lowland Rice. *Journal of Plant Nutrition*, 24: 441-457.

Oliveira, C.R.M.; Oliva, M.A.; Pereira, E.G. (2007) Efeito do material particulado de ferro no teor de pigmentos de *Schinus terebinthifolius* Raddi. *Revista Brasileira de Biociências*, 5: 681-683.

Otton, J.C.G.; Benckiser, G.; Watanabe, I.; Santiago, S. (1982) Multiple nutritional soil stress as the prerequisite for iron toxicity of wetland rice (*Oryza sativa* L.). *Tropical Agriculture*, 60: 102-106.

Pereira, B.F.F. (2005) *Potencial fitorremediador das culturas de feijão-de-porco, girassol e milho cultivadas em latossolo vermelho contaminado com chumbo*. Dissertação de mestrado: Campinas, Instituto agrônomo, 68p.

Pereira, E.G. (2009) *Efeitos tóxicos do ferro: alterações fisiológicas e morfológicas em plantas cultivadas e de restinga*. Tese de doutorado: Universidade Federal de Viçosa, 117p.

Pilon-Smits, E. (2005) Phytoremediation. *Annual Review of Plant Biology*, 56:15-39.

Pires, F.R.; Souza, C.M.; Silva, A.A.; Queiroz, M.E.I.R.; Procópio, S.O.; Santos, J.B.; Santos, E.A.; Cecon, P.R. (2003). Seleção de plantas com potencial de fitorremediação de Tebuthiuron. *Planta Daninha*, 21: 451-458.

Rascio, N.; Navari-Izzo, F. (2011) Heavy metal hyperaccumulating plants: How and why do they do it? And what makes them so interesting? *Plant Science*, 180: 169–181.

Ravet, K.; Touraine, B.; Boucherez, J.; Briat, J.; Gaymard, F.; Cellier, F. (2009) Ferritins control interaction between iron homeostasis and oxidative stress in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 57: 400–412.

Rocha, C.F.D.; Bergallo, H.G.; Alves, M.A.S.; Van Sluys, M. (2003) *A biodiversidade nos grandes remanescentes florestais do estado do Rio de Janeiro e nas restingas da mata Atlântica*. São Carlos: Editora RiMa, 134 p.

Sahrawat, K.L. (2000) Elemental composition of the rice plant as affected by iron toxicity under field conditions. *Soil Science and Plant Analysis*, 31: 2819-2827.

Sant'Anna-Santos, B.F.; Silva, L.C.; Azevedo, A.A.; Araujo, J.M.; Alves, E.F.; Silva, E.A.M. & Aguiar, R. (2006) Effects of simulated acid rain on the foliar micromorphology and anatomy of tree tropical species. *Environmental and Experimental Botany*, 58: 158-168.

Sant'Anna-Santos, B.F.; Azevedo, A.A. (2007) Aspectos morfoanatômicos da fitotoxidez do flúor em duas espécies tropicais. *Revista Brasileira de Biociências*, 5: 48-50.

Sant'Anna-Santos, B.F.; Duque-Brasil, R.; Azevedo, A.A.; Silveira, A.S.; Araujo, J.M. & Aguiar, R. (2007) Utilização de parâmetros morfoanatômicos na análise da fitotoxidez do flúor em folhas de *Magnolia ovata* St.-Hil.) Spreng. (Magnoliaceae). *Revista Árvore*, 31: 761-771.

Schmidt, W. (1999) Review mechanisms and regulation of reduction-based iron uptake in plants. *New Phytologist*, 141: 1-26.

Schützendübel, A.; Polle, A. (2002) Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *Journal of Experimental Botany*, 53: 1351-1365.

Sgherri, C.; Cosi, E.; Navari-Izzo, F. (2003) Phenols and antioxidative status of *Raphanus sativus* grown in copper excess. *Physiologia Plantarum*, 118: 21–28.

Silva, L.C. ; Azevedo, A. A. (2007) Anatomia de plantas de restinga e sua aplicação como ferramenta para a bioindicação. In: Luiz Fernando Tavares Menezes; Fábio Ribeiro Pires; Oberdan José Pereira. (Org.). *Ecossistemas Costeiros do Espírito Santo - Conservação e restauração*. Vitória: EDUFES, p. 213-233.

Silva, L.C.; Azevedo, A.A.; Silva, E.A.M.; Oliva, M.A. (2000) Flúor em chuva simulada: sintomatologia e efeitos sobre a estrutura foliar e o crescimento de plantas arbóreas. *Revista Brasileira de Botânica*, 23: 383-391.

Silva, L.C.; Oliva, M.A.; Azevedo, A.A.; Araújo, J.M. (2006) Responses of restinga plant species to pollution from an iron pelletization factory. *Water, Air and Soil Pollution*, 175: 241-256.

Silveira, V.C.; Oliveira, R.A.; Sperotto, R.A.; Espindola, L.S.; Amaral, L.; Dias, J.F.; Cunha, J.B.; Fett, J.P. (2007) Influence of iron on mineral status of two rice (*Oryza sativa* L.) cultivars. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 12: 127-139.

Siqueira-Silva, A.I.; Silva, L.C.; Azevedo, A.A.; Oliva, M.A. (2011) Iron plaque formation and morphoanatomy of roots from species of restinga subjected to excess iron. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 78: 265-275.

Suh, H.; Kim, C.S.; Lee, J.; Jung, J. (2002) Photodynamic effect of iron excess on photosystem II function in pea plants. *Photochemistry and Photobiology*, 75: 513-518.

Terry, N. (1980) Limiting factors in photosynthesis. I. Use of iron stress to control photochemical capacity *in vivo*. *Plant Physiology*, 65: 114-120.

Tsai, T.; Huang, H. (2006) Effects of iron excess on cell viability and mitogen-activated protein kinase activation in rice roots. *Physiologia Plantarum*, 127: 583–592.

Williams, L.E.; Pittman, J.K.; Hall, J.L. (2000) Emerging mechanisms for heavy metal transport in plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1465: 104-126.

Winkel-Shirley, B. (2002) Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Current Opinion in Plant Biology*, 5: 218–223.

Yamauchi, M. (1989) Rice bronzing in Nigeria caused by nutrient imbalances and its control by potassium sulfate application. *Plant and Soil*, 117: 275-286.

Zhang, X.; Zhang, F.; Mao, D. (1999) Effect of iron plaque outside roots on nutrient uptake by rice (*Oryza sativa* L.): Phosphorus uptake. *Plant and soil*, 209: 187-192.

CAPÍTULO 1

Efeitos do acúmulo de ferro na composição mineral e no crescimento de duas espécies de gramíneas

RESUMO – A utilização de espécies vegetais na recuperação de áreas contaminadas por ferro exige conhecimento prévio sobre o comportamento dessas espécies em respostas a níveis elevados desse elemento. Assim, os objetivos desse estudo foram avaliar a influência de diferentes concentrações de ferro sobre a capacidade de acúmulo desse metal pesado, a composição mineral e o crescimento de *Setaria parviflora* (Poir.) Kerguélen e *Paspalum urvillei* Steudel. Mudanças dessas espécies foram cultivadas em solução nutritiva de Hoagland a meia força iônica e submetidas, gradativamente, às diferentes concentrações de Fe^{3+} , na forma Fe-EDTA (0,009; 1; 2; 4 e 7 mM). As plantas permaneceram expostas ao tratamento por 17 dias. Foram determinados: os macro e micronutrientes presentes na solução recém-preparada e após 17 dias de exposição ao tratamento; a composição química da placa de ferro presente na superfície radicular; o peso seco da parte aérea e radicular e os nutrientes na matéria seca. Além disso, foram calculados o fator de translocação (FT) e fator de bioconcentração (FBC) do ferro e analisadas as seguintes variáveis de crescimento: diâmetro da touceira, número de colmos vivos, número de folhas, comprimento da maior raiz e volume radicular. Os dados foram submetidos à análise de variância, e as médias, comparadas pelo teste de Tukey, a 5%. O maior valor de Fe presente na placa foi encontrado na concentração 7 mM de Fe-EDTA para ambas as espécies. A concentração dos nutrientes Fe, Mn, Zn, P, K, Ca e Mg na placa de ferro diferiram em relação aos tratamentos. *S. parviflora* acumulou nas raízes 266,25 mg/Kg de Fe-EDTA a mais do que *P. urvillei*. Na parte aérea, *S. parviflora* apresentou maiores teores de ferro em quase todos os tratamentos, exceto em 7 mM de Fe-EDTA. O excesso de ferro alterou significativamente o teor de Fe, Cu, K e Mg nas raízes e Fe, Mn, Zn, N, P, K, Ca e Mg na parte aérea. Entre os parâmetros de crescimento avaliados, o peso da matéria seca da parte aérea e da raiz, o número de folhas e o volume das raízes apresentaram diferença significativa em relação às doses de Fe-EDTA. Além de tolerar altas concentrações de ferro no substrato, *S. parviflora* e *P. urvillei* acumularam elevados teores desse elemento na parte aérea e, principalmente, nas raízes. Apesar disso e da desordem nutricional de alguns nutrientes,

o excesso de ferro não reduziu o crescimento das espécies estudadas. *P. urvillei* e *S. parviflora* são, portanto, espécies indicadas para utilização em áreas impactadas pelo excesso de ferro como fitoextratoras, principalmente *P. urvillei* que acumulou mais ferro na parte aérea do que *S. parviflora*.

Palavras-chave: *Setaria parviflora*, *Paspalum urvillei*, poluição, nutrição mineral, espécie acumuladora.

1. Introdução

O ferro é um elemento abundante na crosta terrestre e um micronutriente essencial às plantas. No solo, ele é encontrado principalmente como constituinte de oxi-hidróxido, produzidos pelo intemperismo de rochas, que são instáveis e pouco solúveis (Guerinot e Yi, 1994). As plantas absorvem o ferro na forma de íons ferroso (Fe^{2+}) e férrico (Fe^{3+}). O Fe^{2+} é relativamente solúvel, porém, facilmente oxidado pelo oxigênio da atmosfera. A solubilidade do Fe^{3+} , entretanto, diminui drasticamente com o aumento do pH (Hell e Stephan, 2003).

As plantas apresentam estratégias que as fazem superar a baixa disponibilidade do ferro, aumentando sua taxa de absorção. A estratégia utilizada pelas gramíneas é descrita como estratégia de “quelção”, onde os fitosideróforos, sintetizados pelas plantas, são secretados na rizosfera onde se ligam ao Fe^{3+} (Conte e Walker, 2011). Fitossideróforos são aminoácidos não protéicos que pertencem à classe de compostos chamados ácidos mugênicos, que possuem alta afinidade com o ferro (Schmidt, 1999; Conte e Walker, 2011). O influxo do complexo Fe^{3+} -fitossideróforo é realizado por um transportador específico, chamado Yellow Stripe1 (YS1) (Hell e Stephan, 2003).

O excesso de ferro no solo pode contribuir para a formação da placa de ferro, que é consequência da oxidação do Fe^{2+} a Fe^{3+} , seguida da precipitação de óxido ou hidróxido de ferro na superfície radicular (Chen et al., 2006). A presença dessa placa na superfície radicular pode limitar a absorção do ferro (Liu et al., 2004) e de outros nutrientes (Siqueira-Silva et al., 2012). Óxidos de ferro presentes no solo possuem o grupo funcional OH que é capaz de reagir com metais, outros cátion e ânions (Kuo, 1986). O hidróxido de ferro presente na placa radicular tem propriedade semelhante aos óxidos de ferro do solo, podendo, também, reagir imobilizando e impedindo a absorção de metais (Batty et al., 2000).

Após a absorção do ferro no simplasto de células radiculares, esse elemento é quelado novamente, o que evita sua precipitação e a formação de radicais livres de oxigênio. Quando o ferro não está ligado a estruturas alvo, como grupos heme ou armazenado como ferritina, a nicotianamina (NA) desempenha papel essencial como principal quelante do ferro livre na célula. O transporte radial das células radiculares para os vasos xilemáticos é realizado através de gradiente de difusão pelo Fe^{2+} - NA.

Quando liberado nos vasos do xilema, o ferro é oxidado a Fe^{3+} devido a mudança do pH e o seu complexo muda de NA para citrato, sendo transportado na forma de Fe^{3+} - Citrato. Nas células adjacentes ao xilema, na lâmina foliar, o ferro novamente é mediado pelo complexo Fe^{2+} - NA. A absorção do ferro por células mesofílicas depende da sua oxidação obrigatória a Fe^{3+} , similar à situação encontrada nas raízes (Hell e Stephan, 2003; Schmidt, 2003; Becker e Asch, 2005; Conte e Walker, 2011).

Devido ao potencial de toxicidade associada ao alto teor de ferro livre nas células, o ferro é armazenado em ferritinas, pois, desse modo, ele não pode reagir com o oxigênio, evitando a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Connolly e Guerinet, 2002; Ravet et al., 2009). Ferritina são proteínas capazes de armazenar até 4.000 átomos de ferro, e sua quantidade é controlada por mecanismos de regulação que refletem a necessidade de homeostase celular do ferro. Mais de 90% dessa proteína está localizada nos cloroplastos, com 75% a 80% presente no estroma do cloroplasto, e o restante associada às membranas dos tilacóides. Além de ser armazenado em ferritinas, o ferro também pode ser estocado no sistema-ferro enxofre e no grupamento heme e ser precipitado nos vacúolos, mitocôndrias e apoplasto (Hell e Stephan, 2003).

O teor elevado de ferro no substrato pode afetar a homeostase celular e causar efeitos tóxicos à planta (Williams et al., 2000; Ducic e Polle, 2005). Partículas de ferro derivadas da britagem e beneficiamento do minério de ferro são insolúveis na solução do solo, estando indisponível às plantas. Porém, o acúmulo dessas partículas em combinação com baixo pH pode aumentar a disponibilidade desse elemento para a vegetação (Kuki et al., 2008). Próxima à restinga no Espírito Santo, em Ubu, está em funcionamento uma usina de pelletização de ferro que prepara o minério para exportação. A alta concentração de minério de ferro em pó e outros dejetos, oriundos das unidades de pelletização, se depositam em uma lagoa de decantação. Nesse corpo d'água é comum encontrar espécies vegetais se desenvolvendo, dentre elas as gramíneas *Setaria parviflora* (Poir.) Kerguelen e *Paspalum urvillei* Steudel.

Dependendo das respostas das plantas expostas a poluentes, estas podem ser classificadas como bioindicadoras, biosensoras, bioacumuladoras e indicadores ecológicos. Bioindicadoras são indivíduos considerados monitores sensíveis que mostram sintomas visíveis como necroses, cloroses e distúrbios fisiológicos.

Biosensoras ou biomarcadoras são plantas classificadas entre as sensíveis e as acumuladoras, que mostram respostas “invisíveis” como mudanças celulares, moleculares, bioquímicas e fisiológicas. Bioacumuladoras são indivíduos tolerantes que acumulam o poluente em seus tecidos. Indicadores ecológicos são populações ou comunidades de plantas que apresentam mudanças na composição de espécies alterando as relações fitossociológicas, como o aparecimento e o desaparecimento de espécies, alterações na densidade e na competição entre espécies (De Temmerman et al., 2004).

Acredita-se que as espécies *S. parviflora* e *P. urvillei* tolerem altas concentrações de ferro por se desenvolverem em ambiente rico desse elemento. São escassos os trabalhos que relacionam o comportamento dessas espécies frente ao excesso do ferro, sendo importantes as informações preliminares para futuros estudos que visem a utilização dessas espécies na recuperação de áreas contaminadas.

Os objetivos desse estudo foram avaliar a influência de diferentes concentrações de ferro sobre a capacidade de acúmulo desse metal pesado na composição mineral e no crescimento de *Setaria parviflora* (Poir.) Kerguélen e *Paspalum urvillei* Steudel.

2. Material e Métodos

2.1. Condições de cultivo e aplicação dos tratamentos

O experimento foi conduzido em casa de vegetação na Universidade Federal de Viçosa, MG, Brasil (649 m altura, 20°45'20" S e 42°52'40" N). Indivíduos das espécies *Setaria parviflora* (Poir.) Kerguélen e *Paspalum urvillei* Steudel (Poaceae) foram coletados na margem da lagoa de decantação de uma usina de pelotização de minério de ferro localizado em Ubu (ES) (20° 46'21, 0" S e 40° 34'52, 3" W). A identidade das espécies foi confirmada pela especialista Hilda Maria Longhi Wagner (Universidade Federal do Rio Grande do Sul).

As mudas foram cultivadas em vasos plásticos de oito litros contendo terra como substrato por aproximadamente 90 dias. Posteriormente, touceiras de cada espécie foram padronizadas visualmente e transferidas para caixas de isopor de 5 litros, separando-se uma touceira por caixa. As touceiras foram mantidas em solução nutritiva de Hoagland (Hoagland e Arnon, 1950), a meia força iônica em pH 5.0, com constante aeração. A solução hidropônica era constituída de 0,5mM $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, 3mM KNO_3 , 2mM

$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 1mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 23,13 μM H_3BO_3 , 4,57 μM $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,382 μM $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,16 μM $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,0695 μM MoO_3 e 9 μM Fe-EDTA. Essa solução foi renovada semanalmente, sendo seu volume completado com água deionizada sempre que necessário. O pH da solução foi ajustado para 5.0 a cada 2 dias usando NaOH ou HCl. Nesse período de aclimação, as plantas foram cortadas na altura do colmo duas vezes para homogeneização das plantas, antes da aplicação dos tratamentos.

As plantas foram submetidas, gradativamente, às diferentes concentrações de Fe^{3+} na solução nutritiva, na forma Fe-EDTA (0,009; 1; 2; 4 e 7 mM). A solução foi trocada a cada 12 horas, com o incremento de 0,25mM de Fe-EDTA até chegar em 1 mM de Fe-EDTA. Após isso, o incremento foi de 2, 4 e 7 mM de Fe-EDTA até obtenção das concentrações finais de ferro.

Após o estabelecimento das concentrações finais, a solução nutritiva era trocada a cada 3 dias, e o pH, ajustado diariamente para 5.0 usando NaOH ou HCl. Após a aclimação, as plantas permaneceram expostas aos tratamentos por 17 dias.

2.2. Concentração de nutrientes na solução nutritiva

Foram determinados os macro e micronutrientes presentes na solução de Hoagland recém preparada e após 17 dias que as plantas foram expostas ao tratamento. Os nutrientes Ca, Mg, Fe, Zn, Cu, Mn, K foram determinados por absorção atômica (modelo Spectra 220 FS, Varian, Austrália). O P foi determinado por colorimetria utilizando método da vitamina C (modificado por Braga e Defelipo, 1974) e o N foi determinado pelo método Kjeldahl descrito por Bataglia et al. (1983).

2.3. Extração e composição química da placa de ferro da superfície radicular

À temperatura ambiente, 7 g de raiz de cada repetição foram colocadas em uma solução de 40 mL de 0,3 M de citrato de sódio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) e 5 mL de 1 M de bicarbonato de sódio (NaHCO_3). Três gramas de ditionito de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) foram adicionados e a mistura foi agitada continuamente por 3 horas em agitador orbital (modelo MA 140, Marconi, Piracicaba, SP) (Taylor e Crowder, 1983). Após esse período, a solução de lavagem foi coletada, e as raízes foram lavadas três vezes com 15 mL de água deionizada. O volume da solução resultante foi ajustada para 100 mL com água deionizada e submetida à quantificação, segundo metodologia descrita no item 2.2.

2.4. Quantificação de nutrientes na matéria seca

As plantas foram separadas em parte aérea e radicular, sendo as raízes lavadas com DCB como descrito no item 2.3. Esse material foi colocado em estufa para secagem a 75°C até atingir peso seco constante, moído em moinho (modelo TE048, Tecnal Marconi, Piracicaba, São Paulo) e peneirado em dimensões menores que 1 mm. Os nutrientes Ca, Mg, Fe, Zn, Cu, Mn, P, K, S foram determinados segundo metodologia de Malavolta et al. (1989), no qual os extratos das amostras foram obtidos por digestão nitroperclórica. Ca, Mg, Fe, Zn, Cu, Mn foram determinados por absorção atômica; P, por determinação colorimétrica utilizando método da vitamina C; K, por fotometria com emissão de chama; S, por determinação colorimétrica. O N foi determinado pelo método Kjeldahl.

2.5. Fator de translocação (FT) e fator de bioconcentração (FBC)

Após quantificar o ferro acumulado na parte aérea e radicular, foi calculado o fator de translocação (FT) e fator de bioconcentração (FBC) conforme metodologia descrita por Bao et al. (2009). O FT é definido como a razão da concentração de ferro na parte aérea da planta e a concentração de ferro nas raízes (mg/Kg).

O FBC é a razão da concentração de ferro na planta e a concentração de ferro na solução nutritiva: $FBC = (C_f - C_i)/C_s$, onde C_f = concentração de ferro no órgão (mg/Kg) exposto ao ferro, C_i = concentração de ferro no órgão (mg/Kg) sem exposição ao excesso de ferro, C_s = concentração de ferro na solução nutritiva (mg/L).

2.6. Variáveis de crescimento

Antes da aplicação dos tratamentos (C_i) e ao final do experimento (C_f) foram analisados: diâmetro da touceira, número de colmos vivos, número de folhas, comprimento da maior raiz e volume radicular. Os valores de taxa de crescimento (%) foram calculados segundo a fórmula: $C_i/C_f \times 100$. Ao final do experimento foi avaliada, também, a matéria seca da parte aérea e raiz das plantas.

2.7. Análise estatística

O delineamento experimental foi o de blocos casualizados, com quatro repetições por tratamento. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), e as

médias, comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, através do programa estatístico SAEG 9.0 UFV (Euclides, 2004).

3. Resultados

3.1. Concentração de nutrientes na solução nutritiva

Nas soluções nutritivas recém preparadas foram observadas diferenças significativas nas concentrações de todos os nutrientes, com exceção do Ca, para às concentrações de Fe-EDTA nos tratamentos (Tab. 1). As maiores diferenças em relação aos tratamentos foram encontradas para os micronutrientes e para o P. As concentrações dos micronutrientes (Mn, Zn) foram aumentadas gradativamente com o incremento do ferro, enquanto que o valor de P obteve diminuição abrupta entre a concentração de 1 e 2 mM de Fe-EDTA.

3.2. Extração e Composição química da placa de ferro da superfície radicular

A composição química na placa de ferro mostrou aumento significativo da concentração de Fe em relação ao tratamento, às espécies e na interação entre eles (Tab. 2). O maior valor de Fe presente na placa foi encontrado na concentração 7 mM de Fe-EDTA para ambas as espécies. *Setaria parviflora* acumulou maior quantidade deste elemento na placa com 352,83 mg L⁻¹ e a espécie *Paspalum urvillei* acumulou 300,38 mg L⁻¹. Apenas na concentração 7 mM de Fe-EDTA os valores de ferro diferiram estatisticamente entre as espécies.

Outros elementos, além do ferro, estavam presentes na placa de ferro. Os nutrientes encontrados na placa que diferiram significativamente em relação aos tratamentos foram: Mn, Zn, P, K, Ca, Mg. Os nutrientes que diferiram em relação às espécies foram: Mn, Zn e K.

Nas duas espécies, a resposta quanto aos nutrientes Mn e P foram semelhantes, com diferença estatística entre os tratamentos com excesso de ferro e o tratamento controle. Porém, comparando o tratamento controle com a maior dose de ferro os valores de Mn diminuíram 42,22% e 63,64% e os valores de P aumentaram 90,24% e 84% para *S. parviflora* e *P. urvillei*, respectivamente (Tab. 2).

Ocorreu aumento na concentração de Zn com o acréscimo das doses de ferro para as duas espécies analisadas, porém esse valor só foi significativo na dose de 4 mM de Fe-EDTA (0,55 mg L⁻¹ para as duas espécies).

Foi observado, também, aumento significativo nos valores de Ca somente na concentração de 1 mM de Fe-EDTA.

Ocorreu diminuição nas concentrações de K em função do aumento das doses de Fe-EDTA. Comparando-se o valor de K no tratamento 1 mM de Fe-EDTA, observou-se que *P. urvillei* acumulou na placa de ferro quase o dobro (179,59 mg L⁻¹) em relação à espécie *S. parviflora* (92,18 mg L⁻¹).

Os teores de Mg na placa de ferro diminuíram e apresentaram valor significativamente menor apenas no tratamento de 7 mM.

Não foi encontrada diferença significativa para o N em nenhum aspecto analisado e o Cu apresentou diferença significativa na interação entre os tratamentos e as espécies estudadas.

3.3. Quantificação de nutrientes na matéria seca

Nas raízes, foi observado aumento significativo da concentração de Fe apenas entre os tratamentos (Tab. 3). Na parte aérea, ocorreu aumento significativo do teor de Fe em relação à concentração de ferro e na interação tratamento e espécie (Tab. 4).

No tratamento com 7 mM de Fe-EDTA os teores de ferro nas raízes foram cerca de 20 e 18 vezes maiores, em relação ao controle, para *S. parviflora* e *P. urvillei*, respectivamente. *S. parviflora* acumulou nas raízes 266,25 mg/Kg de Fe-EDTA a mais do que *P. urvillei* (Tab. 3). Na parte aérea, *S. parviflora* apresentou maiores valores de ferro em quase todos os tratamentos, com exceção da maior concentração na qual *P. urvillei* acumulou 339,50 mg/Kg de Fe-EDTA a mais do que *S. parviflora*. Comparando os valores de ferro entre o tratamento controle e o tratamento com 7 mM de Fe-EDTA, na matéria seca da parte aérea foi possível observar aumento de cerca de 13 e 8 vezes para *P. urvillei* e *S. parviflora*, respectivamente (Tab. 4).

O excesso de ferro alterou significativamente o teor de alguns nutrientes nas raízes, sendo eles Cu, K e Mg. Com a dose maior de ferro, os valores de Cu reduziram quase pela metade na espécie *S. parviflora* e mais do que a metade para a espécie *P. urvillei*. Os valores de K apresentaram diferença significativa em relação aos tratamentos, entre

as espécies e na interação desses. Ocorreu diminuição significativa, também, nos teores de Mg com a elevação da concentração de Fe-EDTA nas duas espécies. O excesso de ferro não alterou a concentração radicular dos elementos Zn, N, P e Ca (Tab. 3).

Com relação ao acúmulo do ferro na parte aérea, o excesso de ferro interferiu significativamente com a maioria dos nutrientes, com exceção para o S e Cu. Com o aumento de Fe-EDTA, houve redução significativa nos valores dos nutrientes Mn, P, Mg para ambas as espécies e de K e Zn apenas para *S. parviflora*. Comparando o tratamento controle e o tratamento com 7 mM de Fe-EDTA foi observado diminuição significativa nos valores de Ca e, também, nos valores de N em relação a concentração 7 mM e 1 mM de Fe-EDTA (Tab. 4).

3.4. Fator de translocação (FT) e fator de bioconcentração (FBC)

As espécies estudadas apresentaram fator de translocação (FT) com diferença significativa entre os tratamentos e as espécies (Tab. 5). As espécies apresentaram maior valor de FT no tratamento controle.

Na parte aérea, o fator de bioconcentração apresentou significância entre os tratamentos, entre as espécies e na interação entre eles. *S. parviflora* bioconcentrou na parte aérea cerca de 3 vezes mais ferro no tratamento com 1 mM de Fe-EDTA do que na concentração de 7 mM de Fe-EDTA. Na parte aérea, *P. urvillei* apresentou menor valor de FBC na concentração de 4 mM de Fe-EDTA que foi cerca de 2 vezes menor do que o encontrado no tratamento com 1 mM. Comparando as espécies, na parte aérea, *S. parviflora* acumulou maior quantidade de ferro e nas raízes, *P. urvillei* obteve maior concentração de ferro. Nas raízes, os maiores valores de FBC também foram encontrados no tratamento com 1 mM de Fe-EDTA (Tab. 5).

3.5. Variáveis de crescimento

Entre os parâmetros de crescimento avaliados, o peso seco da parte aérea e da raiz, o número de folhas e o volume das raízes apresentaram diferença significativa em relação ao excesso de ferro (Tab. 6).

Nas duas espécies estudadas, o peso da matéria seca da parte aérea e raiz diminuíram significativamente na concentração 7 mM de Fe-EDTA em relação ao tratamento controle. Comparando o tratamento controle e o com 7 mM de Fe-EDTA foi

observado aumento significativo de 36,96% e 30,93%, em relação ao número de folhas, para *S. parviflora* e *P. urvillei*, respectivamente. O maior valor de volume de raiz foi observado no tratamento com 4 mM de Fe-EDTA para as espécies estudadas. A matéria seca da raiz e o número de colmos apresentaram diferença estatística em relação às espécies.

4. Discussão

S. parviflora e *P. urvillei* apresentaram capacidade de tolerar altas concentrações de ferro. Essas espécies possuem respostas semelhantes em relação ao local de maior acúmulo desse metal. Os baixos valores de fator de translocação observado nas espécies estudadas significam que grande parte do ferro absorvido não é transferido para a parte aérea, o que é confirmado pelos altos valores de bioconcentração (FBC) de ferro nas raízes. Essa característica também foi relatada para outras espécies (Kuki et al., 2008; Liu et al., 2008; Csog et al., 2011). O teor de ferro acumulado nas raízes das espécies estudadas estavam acima dos níveis considerados críticos para toxicidade de ferro (500 mg Fe/Kg) (Marschner, 1995; Dobermann e Fairhurst, 2000). Esse fato demonstra que *S. parviflora* e *P. urvillei* podem apresentar mecanismos que evitam a translocação do ferro para as partes aéreas, impedindo, assim, o comprometimento do seu desempenho fisiológico.

Apesar das espécies acumularem maior quantidade de ferro nas raízes, elas também apresentaram elevados valores de ferro na parte aérea. Na concentração 7 mM de Fe-EDTA, *S. parviflora* e *P. urvillei* acumularam 620,75 e 960,25 mg.Kg⁻¹ de ferro na parte aérea, respectivamente. Existe uma amplitude nos valores que relacionam a toxicidade do ferro com a sua concentração na folha (300 - 2000 mg.Kg⁻¹) (Becker e Asch, 2005). Essa amplitude é observada devido à especificidade individual que diferentes espécies possuem na presença do excesso de ferro.

O excesso de ferro e a presença da placa de ferro influenciaram de maneiras diferentes a absorção e a translocação de alguns nutrientes para a parte aérea. Resultado semelhante também foi encontrado por outros autores (Bandara e Gunatilake, 1994; Tanaka et al., 1966; Audebert e Sahrawat, 2000; Sahrawat, 2000; Batty et al. 2000; Batty et al. 2002; Pereira, 2009; Siqueira-Silva et al., 2011). A placa reduz a absorção de alguns metais adsorvendo-os na sua superfície e, portanto, aumentando a concentração

desses elementos na sua composição (Batty et al. 2000; Hansel et al., 2001). *S. parviflora* apresentou redução significativa nos valores de Cu nas raízes e aumento em seus valores na placa de ferro, demonstrando que a placa pode ter influenciado o teor desse nutriente nas raízes. Esses resultados são diferentes dos encontrados por Ye et al. (1997), no qual os valores de Cu foram semelhantes aos encontrados nas raízes e na placa de ferro de *Typha latifolia* L.

O teor de P nas folhas de *S. parviflora* e *P. urvillei* ficou abaixo da taxa requerida para o crescimento ótimo vegetal. Segundo Zhang et al. (1999), os fitossideróforos não mobilizam o P adsorvidos na placa de ferro nas raízes de *Oryza sativa*, sendo essa placa considerada um reservatório para esse elemento. Esse fato foi observado em *S. parviflora* e *P. urvillei*, que apresentaram valores de P reduzidos na parte aérea enquanto que na placa de ferro, apresentaram elevados. Plantas com deficiência de P podem apresentar redução no número de folhas (Lynch et al., 1991) e redução no teor de clorofila (Fredeen et al., 1989), pois o P participa de diversas funções fisiológicas e age como elemento essencial nas moléculas que armazenam temporariamente a energia proveniente da respiração e da fotossíntese (Plesnicar et al., 1994).

Os valores de K diminuíram significativamente na placa de ferro e nas raízes de *S. parviflora*, porém, não houve deficiência desse elemento nas raízes. Baixas concentrações de K podem comprometer a habilidade das raízes em oxidar Fe^{2+} a Fe^{3+} resultando na maior absorção de ferro aumentando a probabilidade de ocorrência de toxidez (Trolldenier, 1973). Na parte aérea, esse elemento apresentou redução significativa na concentração 7 mM de Fe-EDTA para as duas espécies estudadas, porém não houve deficiência desse elemento.

Para os valores de Ca, *S. parviflora* e *P. urvillei* apresentaram aumento significativo apenas nas concentrações intermediárias na placa de ferro. Na parte aérea, esse elemento diminuiu significativamente, porém, não foi observada deficiência. O Ca requerido por monocotiledôneas é menor do que para as eudicotiledôneas (Marschner, 1995), e o excesso desse elemento causa precipitação como oxalato de cálcio (Fageria, 1998).

Na placa de ferro, nas raízes e na parte aérea, os valores de Mg reduziram significativamente na concentração 7 mM para as duas espécies estudadas. Apesar disso, essa redução não foi suficiente para ser considerada deficiente em Mg, pois segundo

Marschner (1995) valores de Mg entre 0,15 e 0,35% de matéria seca são ideais para o crescimento vegetal.

Foi observada diminuição dos valores de N com o aumento do ferro, porém não foi observada deficiência desse elemento. Outros trabalhos também relataram a baixa translocação desse elemento quando em excesso de ferro (Snowden e Wheeler, 1995; Siqueira-Silva et al., 2011). A baixa taxa desse elemento pode causar senescência das folhas velhas, desarranjo no balanço hormonal e influenciar na produção de lignina em gramíneas, pois o N faz parte de aminoácidos precursores da síntese desse composto (Marschner, 1995).

Nesse trabalho, a placa de ferro foi capaz de imobilizar nutrientes que poderiam ser absorvidos pelas plantas, a placa foi composta por Fe, Mg, Cu, Zn, N, P, K, Ca, Mg. Segundo Liu et al. (2008), devido à composição da placa, ela tem a capacidade de sequestrar, absorver ou precipitar, íons da rizosfera. A capacidade da placa em acumular metais é limitada e depende de fatores como a sua extensão, a concentração do metal, o pH da solução e a idade da raiz (Ye et al., 1997). Portanto, a placa de ferro alteraria a absorção de elementos essenciais, causando distúrbios nutricionais (Howeler, 1973; Zhang et al., 1999; Batty et al., 2000), e de outros metais pesados e metalóides fitotóxicos (Chen et al., 2006; Bravin et al., 2008; Deng et al., 2010). Segundo alguns autores, a presença da placa de ferro nas raízes pode reduzir a assimilação de ferro pelas plantas, sendo um mecanismo de proteção contra a toxidez do ferro (Batty et al., 2000; Batty e Younger, 2003; Liu et al., 2004). Porém, nas espécies estudadas, isso não foi observado, visto que altas concentrações de ferro foram encontradas nos tecidos vegetais. Alguns trabalhos relataram que a placa de ferro também agiria como um sequestrador de nutrientes causando redução de nutrientes disponíveis para a planta (Greipsson e Crowder, 1992).

As espécies apresentam respostas distintas em relação ao excesso de ferro. *S. parviflora* acumulou mais ferro na placa de ferro do que *P. urvillei*. *S. parviflora* também acumulou mais ferro nas raízes, diferente de *P. urvillei*, que na concentração 7 mM de Fe-EDTA, acumulou maior concentração de ferro na parte aérea. Esse fato demonstra que *P. urvillei* obteve maior fator de bioconcentração para a parte aérea na concentração de 7 mM de Fe-EDTA.

Apesar das desordens nutricionais e do alto teor de ferro na parte aérea e nas raízes não foram observadas reduções nos parâmetros de crescimento nas espécies estudadas, com excessão do peso da matéria seca da parte aérea e raiz. *S. parviflora* e *P. urvillei* podem ser classificadas como plantas tolerantes, que segundo Fayiga et al. (2004), podem ser utilizadas em estratégias efetivas de fitorremediação.

Além de tolerar altas concentrações de ferro no substrato, *S. parviflora* e *P. urvillei* acumulam elevados teores desse elemento na parte aérea e, principalmente, nas raízes. Apesar disso, juntamente com a desordem nutricional para alguns nutrientes, o excesso de ferro não reduziu o crescimento das espécies. Algumas características são necessárias para selecionar espécies que serão utilizadas em processos de fitorremediação, como tolerar altas concentrações do poluente no meio, retendo-o no sistema radicular ou translocando-o para a parte aérea, possuir alta taxa de crescimento e produção de biomassa, ter fácil propagação e ocorrer naturalmente em áreas poluídas (Vose et al., 2000). As espécies estudadas apresentam características necessárias para serem utilizadas em áreas impactadas por ferro. Portanto, *S. parviflora* e *P. urvillei* são indicadas para estudos *in situ* visando avaliar sua função fitoextratora de ferro, principalmente *P. urvillei* que acumulou mais ferro na parte aérea do que *S. parviflora*.

5. Referências Bibliográficas

- Audebert, A.; Sahrawat, K.L. (2000) Mechanisms for iron toxicity tolerance in lowland rice. *Journal of Plant Nutrition*, 23: 1877-1885.
- Bandara, W.M.J.; Gunathilake, G.A. (1994) Effect of applied potassium and phosphorus on bronzing in rice grown in iron toxic soils. *Journal of the National Science Council of Sri Lanka*, 22: 219-230.
- Bao, T.; Sun L.; Sun, T.; Zhang, P.; Niu, Z. (2009) Iron-deficiency induces cadmium uptake and accumulation in *Solanum nigrum* L. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 82: 338-342.
- Bataglia, O.C.; Furlani, A.M.C.; Teixeira, J.P.F.; Furlani, P.R.; Gallo, J.R. (1983) *Métodos de análise química de plantas*. Campinas, Instituto Agrônômico de Campinas, 48p.
- Batty, L.C.; Baker, A.J.M.; Wheeler, B.D.; Curtis, C.D. (2000) The effect of pH and plaque on the uptake of Cu and Mn in *Phragmites australis* (Cav.) Trinex. Steudel. *Annals of Botany*, 86: 647-653.

Batty, L.C.; Baker, A.J.M.; Wheeler, B.D. (2002) Aluminium and phosphate uptake by *Phragmites australis*: the role of Fe, Mn and Al root plaques. *Annals of Botany*, 89: 443–449.

Batty, L.C.; Younger, P.L. (2003) Effects of external iron concentration upon seedling growth and uptake of Fe and phosphate by the common reed, *Phragmites australis* (Cav.) Trin ex. Steudel. *Annals of Botany*, 92: 801–806.

Becker, M.; Asch, F. (2005) Iron toxicity in rice conditions and management concepts. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 168: 558–573.

Braga, J.M.; Defelipo, B. (1974) Determinação espectrofotométrica de fósforo em extratos de solos e plantas. *Revista Ceres*, 21: 73–85.

Bravin, M.N.; Travassac, F.; Le Floch, M.; Hinsinger, P.; Garnier, J.M. (2008) Oxygen input controls the spatial and temporal dynamics of arsenic at the surface of a flooded paddy soil and in the rhizosphere of lowland rice (*Oryza sativa* L.): a microcosm study. *Plant Soil*, 312: 207–218.

Chen, R.F.; Shen, R.F.; Gu, P.; Dong, X.Y.; Du, C.W.; Ma, J.F. (2006) Response of rice (*Oryza sativa*) with root surface iron plaque under aluminium stress. *Annals of Botany*, 98: 389–395.

Connolly, E.L.; Guerinot, M.L. (2002) Iron stress in plants. *Genome Biology*, 3: 10241–10244.

Conte, S.S.; Walker, E.L. (2011) Transporters contributing to iron trafficking in plants. *Molecular Plant*, 4: 464–476.

Csog, A.; Mihucz, V.G.; Tatár, E.; Fodor, F.; Virág, I.; Majdik, C.; Záray, G. (2011) Accumulation and distribution of iron, cadmium, lead and nickel in cucumber plants grown in hydroponics containing two different chelated iron supplies. *Journal of Plant Physiology*, 168: 1038–1044.

De Temmerman, L.; Bell, J.N.B.; Garrec, J.P.; Klumpp, A.; Krause, G.H.M.; Tonneijck, A.E.G. (2004) Biomonitoring of air pollutants with plants - considerations for the future. In: A. Klumpp; W. Ansel & G. Klumpp (eds.): *Urban air pollution, bioindication and environmental awareness*. Göttingen, Cuvillier Verlag.

Deng, D.; Sheng-Chun, W.; Fu-Yong, W.; Deng, H.; Ming-Hung, W. (2010). Effects of root anatomy and Fe plaque on arsenic uptake by rice seedlings grown in solution culture. *Environment Pollution*, 158: 2589–2595.

Dobermann, A.; Fairhurst, T. (2000) Toxicidad de hierro en arroz. In: Dobermann, A.; Fairhurst, T. (Eds.), *Rice: nutrient disorders & nutrient management*. Potash and Phosphate Institute and International Rice Research Institute, p. 1–4.

Ducic, T.; Polle, A. (2005) Transport and detoxification of manganese and copper in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 17: 103–112.

- Euclides R.F. (2004) *Sistema para análises estatísticas (SAEG 9.0)*. Viçosa: Funarbe.
- Fageria, N.K. (1998) Otimização da eficiência nutricional na produção das culturas. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, 2: 6-16.
- Fayiga, A.O.; Ma, L.Q.; Cao, X.; Rathinasabapathi, B. (2004) Effects of heavy metals on growth and arsenic accumulation of arsenic hyperaccumulator *Pteris vittata* L. *Environmental Pollution*, 132: 289 – 296.
- Fredeen, A.L.; Rao, M.; Terry, N. (1989). Influence of phosphorus nutrition on growth and carbon partitioning in *Glycine max*. *Plant Physiology*, 89, 225-30.
- Greipsson, S.; Crowder, A.A. (1992). Amelioration of copper and nickel toxicity by iron plaque on roots of rice (*Oryza sativa*). *Canadian Journal of Botany*, 70: 824-830.
- Guerinot, M.L.; Yi, Y. (1994) Iron: nutritious, noxious, and not readily available. *Plant Physiology*, 104: 815-820.
- Hansel, C.M.; Fendorf, S.; Sutton, S.; Newville, M. (2001) Characterization of Fe plaque and associated metals on the roots of mine-waste impacted aquatic plants. *Environmental Science and Technology*, 35: 3863 – 3868.
- Hell, R.; Stephan, U.W. (2003) Iron uptake, trafficking and homeostasis in plants. *Planta*, 216: 541–551.
- Hoagland, D.R.; Arnon, D.I. (1950) The waterculture method for growing plants without soil. *Berkeley: California Agricultural Experiment Station*, 32 p.
- Howeler, R.H. (1973) Iron-induced orangine disease of rice in relation to physicochemical change in a flooded oxisol. *Proceedings of the Soil Science Society of America*, 37: 898-903.
- Kuki, K.N.; Oliva, M.A.; Pereira, E.G. (2008) Iron ore industry emissions as a potential ecological risk factor for tropical coastal vegetation. *Environmental Management*, 42: 111-121.
- Kuo, S. (1986) Concurrent sorption of phosphate and zinc, cadmium, or calcium by a hydrous ferric oxide. *Soil Science Society of America Journal*, 50: 1412-1419.
- Liu, H.; Zhang, J.; Christie, P.; Zhang, F. (2008) Influence of iron plaque on uptake and accumulation of Cd by rice (*Oryza sativa* L.) seedlings grown in soil. *Science of the Total Environment*, 394: 361-368.
- Liu, W.J.; Zhu, Y.G.; Smith, F.A.; Smith, S.E. (2004) 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.
- Lynch, J.; Lauchli, A.; Epstein, E. (1991) Vegetative growth of the common bean in response to P nutrition. *Crop Science*, 31: 380-387

Malavolta, E.; Vitti, G.C.; Oliveira, S.A. (1989) *Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações*. Piracicaba, Potafos. 201p.

Marschner, H. (1995) *Mineral nutrition of higher plant*. 2.ed. NewYork: Academic Press. 889p.

Pereira, E.G. (2009) *Efeitos tóxicos do ferro: alterações fisiológicas e morfológicas em plantas cultivadas e de restinga*. Tese de doutorado: Universidade Federal de Viçosa, 117p.

Plesnicar, M.; Kastori, R.; Petrovic, N.; Pankovic, D. (1994) Photosynthesis and chlorophyll fluorescence in sunflower (*Helianthus annuus* L.) leaves as affected by phosphorus nutrition. *Journal of Experimental Botany*, 45: 919–924.

Ravet, K.; Touraine, B.; Boucherez, J.; Briat, J.; Gaymard, F.; Cellier, F. (2009) Ferritins control interaction between iron homeostasis and oxidative stress in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 57: 400–412.

Sahrawat, K.L. (2000) Elemental composition of the rice plant as affected by iron toxicity under field conditions. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 31: 2819-2827.

Schmidt, W. (1999) Review mechanisms and regulation of reduction-based iron uptake in plants. *New Phytologist*, 141: 1-26.

Schmidt, W. (2003) Iron solutions: acquisition strategies and signaling pathways in plants. *Plant Science*, 8: 188-193.

Siqueira-Silva, A.I.; Silva, L.C.; Azevedo, A.A.; Oliva, M.A. (2011) Iron plaque formation and morphoanatomy of roots from species of restinga subjected to excess iron. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 78: 265-275.

Snowden, R.E.; Wheeler, B.D. (1995) Chemical changes in selected wetland plant species with increasing Fe supply, with specific reference to root precipitates and Fe tolerance. *New Phytologist*, 131: 503-520.

Tanaka, A.; Loe, R.; Navasero, S.A. (1966) Some mechanisms involved in the envelopment of iron toxicity symptoms in the rice plant. *Soil Science & Plant Nutrition*, 12: 32–38.

Taylor, G.J.; Crowder, A.A. (1983) Use of the DCB technique for extraction of hydrous iron oxides from roots of wetland plants. *American Journal of Botany*, 70: 1254-1257.

Trolldenier, G. (1973) Secondary effects of potassium and nitrogen on rice: Changes in microbial activity and iron reduction in the rhizosphere. *Plant Soil*, 38:267-279.

Vose, J.M.; Wayne, T.S.; Harvey, G.J.; Clinton, B.D.; Sobek, C. (2000) Leaf water relations and sapflow in Eastern cottonwood (*Populus deltoides* Bartr.) trees planted for

phytoremediation of a groundwater pollutant. *International Journal of Phytoremediation*, 2: 53-73.

Williams, L.E.; Pittman, J.K.; Hall, J.L. (2000) Emerging mechanisms for heavy metal transport in plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1465: 104-126.

Ye, Z.H., Baker, A.J.M.; Wong, M.H.; Willis, A.J. 1997. Copper and nickel uptake, accumulation and tolerance in *Typha latifolia* with and without iron on the root surface. *New Phytologist*, 136: 481-488.

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

Tabela 1: Concentrações de nutrientes (mg L^{-1}) presentes na solução nutritiva recém preparada nas diferentes concentrações de Fe-EDTA.

Fe-EDTA	Fe	Mn	Zn	N	P	K	Ca	Mg
0,009 mM	0,25 ^e	0,25 ^e	0,04 ^e	0,96 ^b	1,63 ^a	107,71 ^c	79,17 ^a	25,68 ^a
1 mM	33,50 ^d	0,54 ^d	0,22 ^d	1,03 ^{ab}	1,35 ^a	107,24 ^c	89,35 ^a	19,81 ^c
2 mM	68,72 ^c	0,79 ^c	0,40 ^c	1,07 ^a	0,10 ^b	109,37 ^{bc}	95,41 ^a	21,22 ^b
4 mM	153,45 ^b	1,33 ^b	0,85 ^b	1,02 ^{ab}	0,18 ^b	117,18 ^a	86,36 ^a	20,79 ^{bc}
7 mM	243,22 ^a	2,04 ^a	1,52 ^a	1,05 ^a	0,20 ^b	112,23 ^b	95,14 ^a	20,70 ^{bc}

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 2: Nutrientes minerais (mg L⁻¹) presentes na placa de ferro das espécies *Setaria parviflora* e *Paspalum urvillei* após 17 dias de tratamento com diferentes concentrações de Fe-EDTA.

Espécie	Fe-EDTA	Fe	Mn	Cu	Zn	N	P	K	Ca	Mg
<i>Setaria parviflora</i>	0,009 mM	2,82 ^{Ad}	2,25	0,06 ^{Aa}	0,39	0,15	9,20	136,61	11,10	6,59
	1 mM	125,51 ^{Ac}	1,65	0,01 ^{Ba}	0,44	0,05	82,03	92,18	23,26	6,94
	2 mM	142,11 ^{Ac}	1,10	0,02 ^{Ba}	0,55	0,08	70,50	82,93	17,16	4,95
	4 mM	241,41 ^{Ab}	1,21	0,04 ^{Aa}	0,55	0,14	84,40	70,32	18,38	5,27
	7 mM	352,83 ^{Aa}	1,30	0,07 ^{Aa}	0,61	1,31	94,25	56,30	18,17	4,79
<i>Paspalum urvillei</i>	0,009 mM	1,67 ^{Ac}	0,99	0,04 ^{Abc}	0,18	0,19	13,00	191,36	10,25	6,89
	1 mM	93,81 ^{Ad}	0,42	0,07 ^{Ab}	0,35	0,12	64,15	179,59	24,26	7,10
	2 mM	157,43 ^{Ac}	0,37	0,09 ^{Aa}	0,38	0,14	79,73	143,47	16,68	5,76
	4 mM	231,73 ^{Ab}	0,42	0,05 ^{Aabc}	0,55	0,13	76,45	111,95	15,76	5,53
	7 mM	300,38 ^{Ba}	0,36	0,01 ^{Bc}	0,37	0,16	81,28	94,88	14,62	4,37
<i>Análise de variância</i>										
Fe-EDTA (Fe)		*	*	n.s.	*	n.s.	*	*	*	*
Espécie (Esp)		*	*	n.s.	*	n.s.	n.s.	*	n.s.	n.s.
Fe X Esp		*	n.s.	*	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Bloco		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Letras maiúsculas comparam espécies na mesma concentração de Fe-EDTA quando há interação entre as concentrações de ferro e as espécie e letras minúsculas comparam os tratamentos de Fe-EDTA nas espécies. (n.s. = não significativo).

Tabela 3: Nutrientes minerais presentes na matéria seca das raízes de *Setaria parviflora* e *Paspalum urvillei* após 17 dias de tratamento nas diferentes concentrações de Fe-EDTA.

	Fe-EDTA	Micronutrientes [mg/Kg]					Macronutrientes [g/Kg]				
		Fe	Mn	S	Cu	Zn	N	P	K	Ca	Mg
<i>Setaria parviflora</i>	0,009 mM	306,75	105,25 ^{Aa}	1,55 ^{Ab}	28,25	39,50	2,03	0,15	0,18 ^{Ba}	0,10	0,03
	1 mM	1539,00	98,50 ^{Aa}	1,56 ^{Ab}	15,25	50,25	1,96	0,17	0,16 ^{Ba}	0,10	0,04
	2 mM	1756,75	111,25 ^{Aa}	2,01 ^{Aa}	19,00	48,25	1,96	0,17	0,15 ^{Ba}	0,07	0,03
	4 mM	2906,75	80,75 ^{Aa}	1,74 ^{Ab}	17,00	53,75	1,99	0,17	0,12 ^{Bab}	0,12	0,03
	7 mM	6090,00	34,50 ^{Aa}	1,53 ^{Bb}	14,50	76,75	2,13	0,16	0,07 ^{Ab}	0,07	0,01
<i>Paspalum urvillei</i>	0,009 mM	321,25	16,25 ^{Ba}	1,68 ^{Aa}	15,25	23,25	1,40	0,17	0,35 ^{Ab}	0,13	0,04
	1 mM	1696,50	10,00 ^{Ba}	1,71 ^{Aa}	15,50	27,50	1,10	0,15	0,81 ^{Aa}	0,11	0,06
	2 mM	2749,50	10,50 ^{Ba}	1,53 ^{Ba}	17,50	37,50	1,11	0,15	0,53 ^{Aab}	0,09	0,05
	4 mM	4008,00	17,25 ^{Ba}	1,57 ^{Aa}	11,75	36,00	1,14	0,13	0,24 ^{Ab}	0,09	0,03
	7 mM	5823,75	14,50 ^{Aa}	1,83 ^{Aa}	6,75	41,75	1,14	0,15	0,27 ^{Ab}	0,11	0,03
<i>Análise de variância</i>											
Fe-EDTA (Fe)		*	n.s.	n.s.	*	n.s.	n.s.	n.s.	*	n.s.	*
Espécie (Esp)		n.s.	*	n.s.	*	*	*	n.s.	*	n.s.	*
Fe X Esp		n.s.	*	*	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	*	n.s.	n.s.
Bloco		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Letras maiúsculas comparam espécies na mesma concentração de Fe-EDTA quando há interação entre as concentrações de ferro e as espécie e letras minúsculas comparam os tratamentos de Fe-EDTA nas espécies. (n.s. = não significativo).

Tabela 4: Nutrientes minerais presentes na matéria seca das partes aéreas de *Setaria parviflora* e *Paspalum urvillei* após 17 dias de tratamento nas diferentes concentrações de Fe-EDTA.

	Fe-EDTA	Micronutrientes [mg/Kg]					Macronutrientes [g/Kg]				
		Fe	Mn	S	Cu	Zn	N	P	K	Ca	Mg
<i>Setaria parviflora</i>	0,009 mM	76,50 ^{Ad}	70,00	0,15	5,25	57,75 ^{Aa}	2,01	0,34	2,81	0,30 ^{Ba}	0,16 ^{Ba}
	1 mM	283,00 ^{Ac}	46,25	0,14	5,50	39,00 ^{Ab}	2,09	0,29	2,77	0,24 ^{Ba}	0,15 ^{Ba}
	2 mM	382,50 ^{Abc}	49,25	0,15	5,00	42,25 ^{Ab}	2,12	0,26	2,66	0,27 ^{Aa}	0,15 ^{Ba}
	4 mM	443,50 ^{Ab}	40,25	0,14	4,50	36,00 ^{Ab}	2,04	0,20	2,51	0,21 ^{Ba}	0,13 ^{Ba}
	7 mM	620,75 ^{Ba}	46,75	0,15	4,75	38,00 ^{Bb}	1,93	0,20	2,01	0,22 ^{Ba}	0,13 ^{Ba}
<i>Paspalum urvillei</i>	0,009 mM	71,25 ^{Ad}	149,00	0,24	7,25	54,50 ^{Aab}	2,13	0,42	2,01	0,54 ^{Aa}	0,41 ^{Aa}
	1 mM	212,75 ^{Bc}	138,25	0,24	8,00	47,00 ^{Ab}	2,51	0,37	2,09	0,37 ^{Ab}	0,39 ^{Aa}
	2 mM	257,00 ^{Bbc}	109,00	0,25	7,50	46,25 ^{Ab}	2,29	0,30	2,12	0,34 ^{Ab}	0,30 ^{Ab}
	4 mM	371,50 ^{Bb}	105,00	0,24	7,25	55,75 ^{Aab}	2,16	0,28	1,96	0,31 ^{Ab}	0,30 ^{Ab}
	7 mM	960,25 ^{Aa}	119,00	0,25	7,25	65,50 ^{Aa}	2,16	0,26	1,91	0,35 ^{Ab}	0,30 ^{Ab}
<i>Análise de variância</i>											
Fe-EDTA (Fe)		*	*	n.s.	n.s.	*	*	*	*	*	*
Espécie (Esp)		n.s.	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Fe X Esp		*	n.s.	n.s.	n.s.	*	n.s.	n.s.	n.s.	*	*
Bloco		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	*

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Letras maiúsculas comparam espécies na mesma concentração de Fe-EDTA quando há interação entre as concentrações de ferro e as espécie e letras minúsculas comparam os tratamentos de Fe-EDTA nas espécies. (n.s. = não significativo).

Tabela 5: Fator de translocação (FT) e fator de bioconcentração (FBC) em *Setaria parviflora* e *Paspalum urvillei* nos diferentes tratamentos de Fe-EDTA.

Espécie	Fe-EDTA (mM)	FT	FBC (L Kg ⁻¹)	
			Parte aérea	Raiz
<i>Setaria parviflora</i>	0,009	0,25		
	1	0,18	6,16 ^{Aa}	36,78
	2	0,22	4,45 ^{Aa}	21,10
	4	0,15	2,39 ^{Ab}	16,94
	7	0,10	2,32 ^{Bb}	24,69
<i>Paspalum urvillei</i>	0,009	0,22		
	1	0,12	4,22 ^{Ba}	41,05
	2	0,09	2,70 ^{Ab}	35,34
	4	0,09	1,96 ^{Ac}	24,03
	7	0,17	3,80 ^{Aa}	23,49
<i>Análise de variância</i>				
Fe-EDTA (Fe)		*	*	*
Espécie (Esp)		*	*	*
Fe X Esp		n.s.	*	n.s.
Bloco		n.s.	n.s.	n.s.

Médias seguidas por letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Letras maiúsculas comparam espécies quando há interação entre ferro e espécie e letras minúsculas comparam tratamento Fe-EDTA nas espécies. (n.s. = não significativo).

Tabela 6: Parâmetros de crescimento das espécies *Setaria parviflora* e *Paspalum urvillei* nos diferentes tratamentos de Fe-EDTA.

Espécie	Fe-EDTA	Matéria Seca (g)		Diâmetro da Touceira (cm)	Número de Colmos	Número de Folhas	Comprimento da Raiz (cm)	Volume da Raiz (mL)
		Parte aérea	Raiz					
<i>Setaria parviflora</i>	0,009 mM	68,95	4,91	49,90	38,43	44,47	95,93	66,70
	1 mM	66,47	3,57	61,19	33,22	43,35	91,73	94,45
	2 mM	71,74	4,30	65,92	34,89	45,31	90,15	73,11
	4 mM	70,99	4,85	63,95	50,65	54,50	80,08	159,42
	7 mM	58,42	3,88	58,69	47,34	70,54	96,41	106,64
<i>Paspalum urvillei</i>	0,009 mM	62,74	9,29	55,53	49,60	37,68	84,95	93,65
	1 mM	74,14	7,58	65,65	48,93	52,58	95,14	98,16
	2 mM	73,61	7,43	61,61	65,14	51,49	97,15	91,69
	4 mM	60,77	5,64	58,97	50,39	49,39	87,60	141,31
	7 mM	54,87	6,38	70,76	62,02	59,50	93,70	99,59
<i>Análise de variância</i>								
Fe-EDTA (Fe)		*	*	n.s.	n.s.	*	n.s.	*
Espécie (Esp)		n.s.	*	n.s.	*	n.s.	n.s.	n.s.
Fe X Esp		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Bloco		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Letras maiúsculas comparam espécies na mesma concentração de Fe-EDTA quando há interação entre as concentrações de ferro e as espécie e letras minúsculas comparam os tratamentos de Fe-EDTA nas espécies. (n.s. = não significativo).

CAPÍTULO 2

Influência do excesso de ferro na morfologia e anatomia de *Setaria parviflora* (Poir.) Kerguélen e *Paspalum urvillei* Steudel (Poaceae)

RESUMO – Considerando que as espécies *Setaria parviflora* (Poir.) Kerguélen e *Paspalum urvillei* Steudel ocorrem em ambientes com alta concentração de ferro e acumulam esse metal na matéria seca, objetivou-se, com esse trabalho, caracterizar morfológica e anatomicamente os possíveis efeitos de elevados níveis de ferro nestas espécies. Mudanças de *S. parviflora* e *P. urvillei* foram cultivadas em solução nutritiva de Hoagland, a meia força iônica em pH 5,0. As plantas foram submetidas, gradativamente, às diferentes concentrações de Fe^{3+} na solução nutritiva, na forma Fe-EDTA (0,009; 1; 2; 4 e 7 mM). As plantas permaneceram expostas ao tratamento por 17 dias. Foram fotografados os sintomas visuais causados pelo excesso de ferro em folhas e raízes de todos os tratamentos. Foram coletadas amostras para caracterização estrutural em microscopia de luz; para micromorfometria e para análise histoquímica visando a detecção de ferro nos tecidos. Os dados foram submetidos à análise de variância, e as médias, comparadas pelo teste de Tukey, a 5%. Os sintomas visuais, nas folhas, apareceram de forma mais discreta em *S. parviflora* em relação aos sintomas observados em *P. urvillei*. As raízes das espécies apresentaram mudança na coloração, aspecto mucilaginoso e flacidez. As raízes de *P. urvillei* exibiram, com o aumento da concentração de ferro, alguns pontos necróticos e em *S. parviflora*, observou-se fragilidade nas raízes. *P. urvillei* e *S. parviflora* apresentaram alterações anatômicas semelhantes, como alterações bruscas no formato das células da epiderme, do mesofilo e da bainha do feixe, retração do protoplasto e alteração no formato das células do metaxilema. Além disso, observou-se nas raízes formação de tecido de cicatrização e colapso das células do cilindro vascular em *P. urvillei* e colapso das células do córtex em *S. parviflora*. Em relação às medições realizadas na folha, foi observada redução significativa entre os tratamentos de Fe-EDTA nos valores da altura da epiderme da face abaxial e da bainha do feixe vascular nas duas espécies estudadas. Em relação à histolocalização do ferro, nas folhas de *S. parviflora* foi observado reação mais forte do que nas folhas de *P. urvillei*. Nas raízes das espécies apresentaram reação forte nas células da epiderme e exoderme e reação fraca para as células do córtex nas duas

espécies. As espécies estudadas apresentaram sintomas anatômicos e visuais semelhantes quando expostas ao excesso de ferro, porém, *P. urvillei* mostrou danos mais intensos do que *S. parviflora* e acumulou mais ferro na parte aérea, na maior concentração de ferro em solução hidropônica.

Palavras-chave: espécies de gramíneas, poluição, sintomatologia, alterações anatômicas, morfometria foliar.

1. Introdução

O Brasil possui grande quantidade de reservas de minério de ferro (Araujo et al., 2008) e a exploração crescente dessas reservas têm aumentado as emissões de poluentes atmosféricos produzidos pelas indústrias desse minério. As partículas de ferro emitidas por essas indústrias são insolúveis e indisponíveis às plantas. Porém, o baixo pH do solo pode aumentar a disponibilidade desse elemento para a vegetação, podendo ocasionar problemas ecológicos e até mesmo a redução da biodiversidade (Kuki et al., 2008).

Ambientes contaminados com metais pesados podem selecionar plantas tolerantes, visto que, geralmente, a tolerância a metais é mais observada em populações que vivem em solo enriquecido com metais do que populações da mesma espécie em solos normais (Macnair, 1993; Milner e Kochian, 2008). Portanto, as espécies vegetais podem apresentar estratégias que permitem a sua sobrevivência nos ambientes ricos em metais. Dentre essas estratégias a absorção, a translocação e o acúmulo de altas concentrações do poluente, em uma forma não tóxica, é encontrada em espécies denominadas hiperacumuladoras.

Plantas hiperacumuladoras têm recebido atenção devido à possibilidade de sua utilização como fitorremediadoras em ambientes contaminados (Pilon-Smits, 2005; Coutinho e Barbosa, 2007; Carneiro e Gariglio, 2010; Rascio e Navari-Izzo, 2011). A eficiência na compartimentalização de metais é uma característica fundamental de plantas hiperacumuladoras, permitindo o acúmulo de altos teores de metais pesados em seus tecidos sem apresentar efeitos tóxicos. Essa compartimentalização é fundamental nas folhas, onde está localizado o aparato fotossintético (Rascio e Navari-Izzo, 2011).

Mesmo não interferindo no crescimento vegetal, espécies expostas a altas concentrações de ferro podem apresentar sintomas visuais. O sintoma visual típico de toxicidade por ferro é o bronzeamento foliar que está associado a danos nos componentes celulares e nos processos fisiológicos. O bronzeamento é causado pelo acúmulo de polifenóis oxidados e se inicia em folhas completamente expandidas (Becker e Asch, 2005). Inicialmente, esse sintoma se origina com pequenas manchas marrons que se espalham da região apical para a região mediana da folha. Quando a toxicidade é grande, o bronzeamento ocupa grande parte da lâmina foliar sendo seguido

por necrose (Müller, 2011). Os sintomas observados nas raízes são flacidez, ausência de ramificação, aspecto mucilaginoso e mudança na coloração (Castro, 2010).

Algumas espécies que acumulam altas concentrações de poluentes em seus tecidos não apresentam injúrias visuais (Arndt *et al.* 1995). Porém, estas espécies podem apresentar danos teciduais, ainda não visíveis a olho nu. É, assim, importante realizar análises microscópicas que possam evidenciar danos estruturais e auxiliar no prognóstico da injúria (Silva *et al.*, 2000; Sant'Anna-Santos *et al.*, 2006; Sant'Anna-Santos *et al.*, 2007; Sant'Anna-Santos e Azevedo, 2007). Essas análises microscópicas podem ser tanto quantitativas como qualitativas. As análises quantitativas (micromorfométricas) contribuem para a caracterização quantitativa das alterações na estrutura dos órgãos vegetais de plantas provocadas por agentes externos (Aguilar *et al.*, 2007). Essas análises são geralmente realizadas nas folhas, que é o órgão mais sensível à poluição (Dickison, 2000).

Dependendo da concentração do ferro e da sensibilidade da espécie estudada, algumas alterações anatômicas qualitativas podem ser observadas, entre elas mudanças na divisão das células do meristema apical radicular, alterações nas células do córtex, retração do protoplasto, formação do tecido de cicatrização e alteração no tamanho das células. No cilindro vascular, podem ocorrer mudanças na divisão e no padrão de diferenciação das células do periciclo e incompleta diferenciação do metaxilema (Siqueira-Silva *et al.*, 2011).

As espécies submetidas ao excesso de ferro geralmente histolocalizam-o nos tricomas, cutícula, células epidérmicas, em algumas células do xilema, endoderme da nervura mediana, células parenquimáticas (Silva *et al.*, 2006; Silva e Azevedo, 2007), células da hipoderme, colênquima, clorênquima e floema (Pereira, 2009).

Dependendo da sensibilidade da espécie e da concentração do ferro no substrato pode ocorrer estresse oxidativo através da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) causando, dentre outros efeitos, danos aos tecidos vegetais (Connolly e Guerinot, 2002; Schützendübel e Polle, 2002). O aprimoramento dos sistemas antioxidantes que neutralizam o estresse oxidativo é outra estratégia usada por plantas tolerantes. Compostos fenólicos possuem elevada tendência a quelar metais pesados, que previne a formação de radicais livres. Observa-se na literatura a hipótese de que a

formação de complexos estáveis entre metais e fenóis pode restringir a absorção de metais em plantas e atenuar a toxicidade do metal (Jung et al., 2003).

As gramíneas *Setaria parviflora* (Poir.) Kerguélen e Steudel se desenvolvem em uma lagoa de decantação na usina de pelletização em Ubu-ES. Essa lagoa é abastecida com água do sistema de pelletização e do mineroduto de ferro da usina, sendo, portanto, rica em partículas de ferro. *S. parviflora* e *P. urvillei*, além de tolerar altas concentrações desse poluente no substrato, também, acumulam elevados teores de ferro em seus tecidos sem alterar seu crescimento (resultado do capítulo 1).

Considerando que as espécies *Setaria parviflora* (Poir.) Kerguélen e *Paspalum urvillei* Steudel ocorrem em ambientes com alta concentração de ferro e acumulam esse metal em grande quantidade na matéria seca, objetivou-se, com esse trabalho, verificar se ocorrem alterações morfoanatômicas em respostas a níveis elevados de ferro em *S. parviflora* e *P. urvillei* e determinar os sítios de acúmulo de ferro.

2. Material e Métodos

2.1. Condições de cultivo e aplicação dos tratamentos

O experimento foi conduzido em casa de vegetação da Universidade Federal de Viçosa, MG, Brasil (649 m altura, 20°45'20" S e 42°52'40" N). Indivíduos das espécies *Setaria parviflora* (Poir.) Kerguélen e *Paspalum urvillei* Steudel (Poaceae) foram coletados na margem da lagoa de decantação de uma usina de pelletização de minério de ferro localizado em Ubu (ES) (20° 46'21, 0" S e 40° 34'52, 3" W). A identidade das espécies foi confirmada pela especialista Hilda Maria Longhi Wagner (Universidade Federal do Rio Grande do Sul).

P. urvillei apresenta colmos eretos, subcompridos, glabros, às vezes ramificados; nós salientes, glabros; bainhas glabras superiormente e fino estriadas; lígula membranácea, lateralmente branco-pilosa; lâminas planas, glabras, agudas, pilosas nas margens (Scheffer-Basso et al., 2001). *S. parviflora* apresenta colmos eretos ou geniculados; nós inferiores geniculados; lígula presente; lâminas foliares rígidas, planas ou involutes, glabras ou pilosas (Batalha e Mantovani, 1999).

As mudas foram cultivadas em vasos plásticos de oito litros contendo terra como substrato por aproximadamente 90 dias. Posteriormente, touceiras de cada espécie foram

padronizadas visualmente e transferidas para caixas de isopor de 5 litros, separando-se uma touceira por caixa. As touceiras foram mantidas em solução nutritiva de Hoagland (Hoagland e Arnon, 1950), a meia força iônica em pH 5,0, com constante aeração. A solução hidropônica era constituída de 0,5mM $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, 3mM KNO_3 , 2mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 1mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 23,13 μM H_3BO_3 , 4,57 μM $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,382 μM $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,16 μM $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,0695 μM MoO_3 e 9 μM Fe-EDTA. Essa solução foi renovada semanalmente, sendo seu volume completado com água deionizada sempre que necessário e o pH, ajustado para 5,0 a cada 2 dias usando NaOH ou HCl. Nesse período de aclimação, as plantas foram cortadas na altura do colmo duas vezes para padronização antes de aplicação dos tratamentos.

As plantas foram submetidas, gradativamente, às diferentes concentrações de Fe^{3+} na solução nutritiva, na forma Fe-EDTA (0,009; 1; 2; 4 e 7 mM). A solução foi trocada a cada 12 horas, com o incremento de 0,25mM de Fe-EDTA até chegar em 1 mM de Fe-EDTA. Após isso, o incremento foi de 2, 4 e 7 mM de Fe-EDTA até obtenção das concentrações finais de ferro.

Após o estabelecimento das concentrações finais, a solução nutritiva era trocada a cada 3 dias, e o pH, ajustado diariamente para 5,0 usando NaOH ou HCl. Após a aclimação, as plantas permaneceram expostas aos tratamentos por 17 dias.

2.2 Caracterização visual

Ao final do experimento, foram fotografados, com o auxílio de uma câmera digital (Cyber-Shot DSC-W310, Sony Corporation, Japão) os sintomas visuais causados pelo excesso de ferro em folhas e raízes de *Setaria parviflora* e *Paspalum urvillei*.

2.3 Caracterização estrutural e análise micromorfológica em microscopia de luz

Foram coletadas amostras da margem e nervura mediana de 5 lâminas foliares, sem sintomas, completamente expandidas localizadas entre o 3º e 5º nó e amostras das raízes a 5 cm acima do ápice. As amostras foram fixadas em solução de glutaraldeído (2,5%) e paraformaldeído (4%), em tampão fosfato de sódio 0,1 M (pH 7,0) (Karnovsky, 1965), por 48 horas e estocadas em álcool 70%. Em seguida, foram desidratadas em série etílica e incluídas em glicometacrilato (Leica Historesin, Nussloch/Heidelberg, Germany). Cortes transversais das folhas com 5 μm de espessura e das raízes com 6 μm foram

obtidos em micrótomo rotativo de avanço automático (modelo RM2155, Leica Microsystems Inc., Deerfield, USA), corados com azul de toluidina pH 4,0 e montados entre lâmina e lamínula em Permount.

Foram mensurados, em seções transversais, a altura das células epidérmicas das faces adaxial e abaxial da folha, a espessura do limbo foliar, a altura do mesofilo e da bainha do feixe vascular. Para cada repetição, de todos os tratamentos, foram utilizados 3 fragmentos de folha, sendo realizados 10 cortes/lâmina de cada fragmento. Em cada imagem foram realizadas 3 medições para cada parâmetro por repetição, totalizando 450 imagens por tratamento por parâmetro. As imagens foram realizadas em campos na lâmina que possibilitaram a visualização de três grupos de células buliformes e feixes vasculares. Todas as medidas foram realizadas próximo aos feixes vasculares e na epiderme da face adaxial foi mensurada a maior célula buliforme acima dos feixes. As medições foram realizadas com auxílio do software de análise de imagens Image Pro-Plus versão 4.1 para Windows®.

2.4 Análise histoquímica

Para detectar a presença de ferro nos tecidos das folhas e raízes, após fixação das amostras em Karnovsky, foram realizados cortes transversais das plantas do tratamento 0,019 mM e 7 mM de Fe-EDTA. Esses cortes foram obtidos em micrótomo de mesa (modelo LPC, Rolemberg e Bhering Comércio e Importação LTDA, Belo Horizonte, Brasil). Após lavagem em água destilada, os cortes foram colocados em solução contendo ferricianeto de potássio 4% e ácido clorídrico 4% (Meguro et al., 2007), por um período de 48 horas. Este teste evidencia a presença de ferro pela coloração azul, o Azul de Prússia. Um controle negativo, chamado de branco do teste, no qual os cortes não foram expostos à reação, foi realizado em paralelo. Após lavagem em água destilada, os cortes foram montados em água.

Todas as análises citadas foram realizadas em fotomicroscópio (modelo AX70 TRF, Olympus Optical, Tokyo, Japão) equipado com sistema U-photo, acoplado a uma câmera AxioCam (Carl Zeiss, Jena, Alemanha) e a aquisição das imagens foi realizada usando o software modelo AxioVision LE (Carl Zeiss, Jena, Alemanha) e um microcomputador, do Laboratório de Anatomia Vegetal da UFV.

2.5 Análise estatística

O delineamento experimental foi o de bloco casualizado, com cinco repetições por tratamento. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), e as médias, comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, através do programa estatístico SAEG 9.0 UFV (Euclides, 2004).

3. Resultados

3.1 Caracterização visual

As plantas do tratamento controle das espécies estudadas não exibiram sintomas de toxidez por ferro (Fig. 1A; 1F; 1H; 1M; 2D; 2I). Após exposição ao excesso de ferro, foram observadas alterações na morfologia externa das raízes e folhas de *P. urvillei* e *S. parviflora* (Fig. 1B-E; 1G; 1I-L; 1N; 2A-C; 2E; 2F-H; 2J).

Em *P. urvillei*, os sintomas causados por toxidez de ferro começaram a aparecer na concentração 1 mM de Fe-EDTA de folhas completamente expandidas (Fig. 1B). Bronzeamentos bem pontuais na lâmina foliar alcançando pequenas extensões foram observados, em poucas folhas (Fig. 1B-E; 1G). O bronzeamento foliar foi evoluindo de acordo com o aumento da concentração de ferro: em 2 mM de *P. urvillei* ocorreu em porções maiores da lâmina foliar (Fig. 1C); em 4 mM de Fe-EDTA alcançou número maior de folhas e maior extensão da lâmina foliar (Fig. 1D) ocupando quase toda margem foliar com enrolamento dessas margens (Fig. 1D); na concentração 7 mM de Fe-EDTA foi observado em quase todas as folhas expandidas e em grande parte da lâmina foliar (Fig. 1E). As folhas desse último tratamento apresentaram aspecto menos rígido, além de necroses e aspecto enrugado na região apical (Fig. 1G).

Em *S. parviflora*, a partir de 2 mM de Fe-EDTA, foi observado bronzeamento foliar (Fig. 1J). Em 4 mM de Fe-EDTA, esse sintoma alcançou maior número de folhas e maior extensão na lâmina foliar (Fig. 1K) e na concentração 7 mM de Fe-EDTA, o bronzeamento foi seguido de pequenas necroses e cloroses nas margens da lâmina foliar (Fig. 1L). Os sintomas apareceram de forma mais discreta em *S. parviflora* em relação aos sintomas observados em *P. urvillei*. Não foi observado sintoma de murchamento da parte aérea nas espécies estudadas (Fig. 1G; 1N).

Nas raízes de *P. urvillei*, foram observadas mudança de coloração a partir da concentração 1 mM de Fe-EDTA. À medida que aumentava a concentração de ferro foi

aumentando também a intensidade de coloração amarelada das raízes (Fig. 2A-C; 2E). As raízes de *P. urvillei* submetidas ao tratamento de concentração 1 mM de Fe-EDTA apresentaram aspecto semelhante às raízes do tratamento controle, com mudança sutil na coloração, em todo o comprimento da raiz, de branco (controle) para amarelo (Fig. 2A). Além da disso, na concentração 2 mM de Fe-EDTA as raízes apresentaram coloração amarelada nas extremidades e aspecto mucilaginoso (Fig. 2B). No tratamento com 4 mM foi observado maior intensidade nos sintomas ocorridos no tratamento 2 mM de Fe-EDTA, e aparecimento de alguns pontos necróticos (Fig. 2C). Na concentração 7 mM a coloração amarelada foi observada por todo o comprimento radicular e foi acentuado o aspecto mucilaginoso, foi observado, também, necrose e flacidez (Fig. 2E).

Nas raízes de *S. parviflora* foram observadas coloração alaranjada em toda a superfície radicular, aspecto mucilaginoso, flacidez e fragilidade nas raízes a partir do tratamento 1 mM de Fe-EDTA. Com o aumento das concentrações, esses sintomas foram intensificados (Fig. 2F-H; 2J). Os sintomas nas raízes de *S. parviflora* foram mais severos do que em *P. urvillei* com redução visual das ramificações laterais.

3.2 Caracterização estrutural em microscopia de luz

P. urvillei e *S. parviflora* apresentam folhas com epiderme uniestratificada com células buliformes agrupadas em número de 3 a 5 na epiderme da face adaxial da folha. As espécies apresentaram anatomia de plantas C4 com feixes vasculares de tamanhos variados e bainha do feixe com uma camada de células parenquimáticas, constituindo típica anatomia do tipo Kranz. Na face abaxial e adaxial, próximos aos feixes vasculares maiores, há uma calota de fibras (Fig. 3A; 3B; 4A; 4B). Em *P. urvillei* ocorre predominância de estômato na face abaxial da folha e as células buliformes são volumosas de contorno quadrangular (Fig. 3B); em *S. parviflora* encontram-se estômatos nas duas faces e tricomas unicelulares (Fig. 4B).

Após exposição ao excesso de ferro, *P. urvillei* apresentou na concentração 1 mM de Fe-EDTA desarranjo nas células do mesofilo, presença de células hipertrofiadas, hiperplasia das células do mesofilo localizadas abaixo das células buliformes e retração do protoplasto dessas células (Fig. 3C). Essa espécie, na concentração 2 mM de Fe-EDTA apresentou retração do protoplasto nas células localizadas nas margens e próximas ao feixe vascular, alteração brusca no formato das células da epiderme, do

mesofilo e da bainha do feixe e colapso de algumas células (Fig. 3D; 3E). Na concentração 4 mM de Fe-EDTA foi observado retração do protoplasto (Fig. 3F). No tratamento 7 mM de Fe-EDTA observou-se áreas necrosadas (Fig. 3G; 3H).

S. parviflora não apresentou sintomas de toxidez ao ferro na concentração 1 mM de Fe-EDTA (Fig. 4C). *S. parviflora* apresentou alterações no formato das células do metaxilema na concentração 2 mM de Fe-EDTA (Fig. 4D). No tratamento 4 mM de Fe-EDTA foi observado retração do protoplasto, redução abrupta do limbo foliar com mudanças no formato das células da epiderme das faces abaxial e adaxial da folha e do mesofilo e colapso celular (Fig. 4E). Na concentração 7 mM de Fe-EDTA foi observado conteúdo de coloração esverdeada e marrom corado por azul de toluidina nas células do mesofilo, além de alterações no formato das células (Fig. 4F).

As raízes de *P. urvillei* apresentam epiderme e exoderme com uma camada de células tabulares, com paredes delgadas e menor volume do que as células do córtex. *S. parviflora* possui uma camada de células na epiderme e na exoderme com características semelhantes à epiderme encontrada em *P. urvillei*. No córtex, das duas espécies, observam-se espaços intercelulares com formação de aerênquima, endoderme unisseriada formada por células bem compactadas com espessamento da parede celular em forma de “U”. No cilindro vascular, observa-se na camada mais externa as células do periciclo e mais internamente a presença de uma medula. A raiz é poliarca com diferenciação do xilema ocorrendo centripetamente (Fig. 5A; 6A).

Nas raízes de *P. urvillei*, na concentração de 1 mM foi observado colapso das células do cilindro vascular e do córtex (Fig. 5B); em 2 mM de Fe-EDTA ocorreu retração do protoplasto das células do córtex, da endoderme e colapso celular (Fig. 5C); em 4 mM de Fe-EDTA houve alteração no formato das células da endoderme, do protoxilema e do metaxilema, formação de tecido de cicatrização nas células do córtex e alterações no formato da célula do floema (Fig. 5D); e em 7 mM de Fe-EDTA foi evidente o colapso das células do córtex, retração do protoplasto, alteração do formato das células da endoderme, do periciclo, do protoxilema e do metaxilema (Fig. 5E; 5F).

Em *S. parviflora* na concentração 1 mM de Fe-EDTA foram observadas alterações no formato celular do protoxilema e metaxilema e colapso celular no córtex (Fig. 6B); em 2 mM de Fe-EDTA foi evidenciado colapso das células do córtex (Fig. 6C); em 4

mM de Fe-EDTA ocorreram alterações no formato das células da endoderme, do periciclo, do protoxilema, do metaxilema e das células corticais (Fig. 6D); no tratamento 7 mM de Fe-EDTA além de alterações no formato celular do protoxilema, metaxilema houve colapso das células do córtex (Fig. 6E; 6F).

3.3 Análise micromorfológica

Em relação às medições realizadas na folha, foi observado que na epiderme da face adaxial e abaxial da folha, no mesofilo e bainha do feixe vascular houve diferença significativa entre as espécies. *P. urvillei* apresentou maiores valores de epiderme da face adaxial, do mesofilo e bainha do feixe vascular em relação a *S. parviflora*. Foi observado redução significativa entre os tratamentos de Fe-EDTA nos valores de epiderme da face abaxial e da bainha do feixe vascular nas duas espécies estudadas (Tab. 01).

3.4 Análise histoquímica

Em *P. urvillei*, o ferro não foi histolocalizado nas folhas do tratamento controle (Fig. 7A). Nesse tratamento, observou-se, nas folhas de *S. parviflora*, reação fraca para o ferro (baixa intensidade de coloração azul) nas células da epiderme da face adaxial e abaxial da folha, nos tricomas e estômatos (Fig. 7D). Na concentração 7 mM de Fe-EDTA, com 24h após reação, *P. urvillei* apresentam coloração positiva apenas nas células da bainha do feixe (Fig. 7B) e *S. parviflora* nas células do mesofilo, da bainha do feixe e no estômato (Fig. 7E). Com 48h de exposição ao reagente, as duas espécies apresentaram reação positiva nas células da epiderme das faces adaxial e abaxial das folhas, nos estômatos, nos tricomas (apenas em *S. parviflora*), nas células buliformes, do mesofilo, da bainha do feixe, xilema e floema (Fig. 7C; 7F). Nas folhas de *S. parviflora* foi observado reação mais forte (alta intensidade de coloração azul) do que nas folhas de *P. urvillei*.

As raízes do controle de *P. urvillei* apresentaram reação forte nas células da epiderme e exoderme e reação fraca para as células do córtex, periciclo, xilema e floema (Fig. 8A). *S. parviflora* apresentaram raízes do controle com reação forte para as células da epiderme e fraca para as células do córtex (Fig 8D). Na concentração 7 mM de Fe-EDTA, as células da epiderme e córtex de *P. urvillei* apresentaram reação forte e as

células da endoderme, periciclo, xilema e floema apresentaram reação fraca (Fig. 8B; 8C). Nesse tratamento, *S. parviflora* apresentaram reação forte para as células da epiderme, floema e xilema e reação fraca para as células do córtex, endoderme, periciclo (Fig. 8E; 8F).

4. Discussão

Comparando-se as respostas de *P. urvillei* e *S. parviflora* quando expostas ao excesso de ferro, observa-se diferenças entre as duas espécies sendo que *P. urvillei* apresentou sintomas visuais e anatômicos mais severos do que *S. parviflora*.

As alterações visuais estão diretamente relacionadas ao aumento do teor de ferro no órgão. O principal sintoma visual foliar observado nas espécies estudadas, bronzeamento, é o sintoma típico de toxidez ao excesso de ferro. Esse sintoma está associado a danos nos componentes celulares (Becker e Asch, 2005), e foi observado nas duas espécies estudadas, com presença também de danos celulares.

As mudanças na coloração observadas nas raízes de *P. urvillei* e *S. parviflora* podem ter sido causadas pela formação da placa de ferro que precipita compostos na superfície radicular. Siqueira-Silva et al. (2011) e Snowden & Wheeler (1995) relataram o mesmo resultado, com sintomas como flacidez e escurecimento.

As alterações anatômicas observadas nas duas espécies, como desarranjo no formato, tamanho e organização das células buliformes, retração do protoplasma e alterações no formato celular podem ter sido resultado da peroxidação de lipídios. O excesso de ferro pode induzir essa peroxidação, alterando a estrutura e a permeabilidade da membrana plasmática (Sinha et al., 1997).

O desarranjo nutricional causado pelo excesso de ferro, observado em *P. urvillei* (resultados observado no capítulo 1), pode ter influenciado as alterações anatômicas desenvolvidas. Em *P. urvillei*, que exibiu danos anatômicos mais severos do que *S. parviflora*, o excesso de ferro interferiu diminuindo, na parte aérea, o teor de nitrogênio, potássio e cálcio (resultados observados no capítulo 1). A redução nos valores de potássio e nitrogênio pode ocasionar comprometimento da lignificação do xilema, principalmente o nitrogênio que influencia a produção de lignina em gramíneas, pois faz parte de aminoácidos precursores da síntese desse composto (Marschner, 1995). Assim, as deformações no formato das células do xilema observadas nas folhas e raízes de *P.*

urvillei e *S. parviflora* podem ter sido causadas por problemas na síntese de lignina como consequência da desordem nutricional.

O cálcio atua na composição estrutural das paredes celulares e na regulação da permeabilidade da membrana plasmática (Marschner, 1995). A diminuição no teor desse elemento pode ter tido influência na alteração do formato celular e na retração do protoplasto das espécies estudadas.

A presença de aerênquima, observado nas duas espécies estudadas, propicia o desenvolvimento de uma zona oxidativa nas raízes devido ao aumento do transporte do oxigênio na região radicular (Evans, 2003). Esse fato pode ter contribuído para a oxidação de Fe^{2+} para Fe^{3+} e para a precipitação de oxi-hidróxidos de ferro na superfície radicular (Chen et al., 1980). Ou seja, a presença de aerênquima pode ter favorecido a formação da placa de ferro nas espécies estudadas. Análises ao microscópio eletrônico de varredura deverão ser realizadas a fim de confirmar a presença de placa de ferro nas raízes de *P. urvillei* e *S. parviflora*.

As raízes possuem barreiras que funcionam como proteção contra os efeitos tóxicos causados por metais pesados, a endoderme é uma delas (Lux et al., 2004). Foram observados danos nas células do cilindro vascular das duas espécies estudadas. Assim, pode-se sugerir que essas barreiras não foram efetivas contra a toxidez pelo ferro. A formação do tecido de cicatrização observado em *P. urvillei* funciona como uma barreira que previne o progresso do dano para os tecidos saudáveis. A presença desse tecido de cicatrização é uma resposta da planta a poluentes, e já foi observado em algumas espécies vegetais expostos a diferentes poluentes (Silva et al., 2005; Sant'Anna-Santos et al., 2006). No presente trabalho, este tecido também não foi suficiente para barrar a entrada do poluente provocando danos estruturais.

Nas folhas de *S. parviflora* foram observados sintomas visuais mais amenos em todas as concentrações de Fe-EDTA em relação a *P. urvillei*. As plantas possuem mecanismos homeostáticos que lhes permitem manter íons metálicos essenciais em compartimentos celulares minimizando os efeitos nocivos do excesso desses íons (Clemens et al., 2002; Michalak, 2006). *S. parviflora* pode estar compartimentalizando o excesso de ferro em regiões da célula que não comprometam o funcionamento fotossintético, evitando a produção de espécies reativas de oxigênio, impedindo, dentre

outros sintomas, o dano celular. Segundo Zobel (1996), o extravasamento de compostos fenólicos do vacúolo acontece devido ao rompimento das membranas celulares, surgindo, desta forma, as necroses. As raízes de *P. urvillei* acumulam altas concentrações de ferro. Talvez, a compartimentalização desse metal nesse órgão não seja tão eficiente quanto em *S. parviflora*. Portanto, a produção de antioxidantes pode estar prevenindo a formação de radicais livres, atenuando a toxicidade do ferro nessas raízes. Neste trabalho, não foram avaliadas as enzimas antioxidativas, sendo fundamental sua avaliação em estudos futuros.

O ferro é geralmente armazenado em ferritinas, dessa forma ele não reage com o oxigênio (Connolly e Guerinot, 2002; Ravet et al., 2009). Na célula, mais de 90% desse ferro armazenado em ferritinas é, normalmente, localizado nos cloroplastos (Hell e Stephan, 2003). Em *P. urvillei* na concentração 7 mM de Fe-EDTA o ferro foi histolocalizado, depois de 24h, apenas nas células da bainha do feixe vascular. Em *S. parviflora*, o ferro foi histolocalizado principalmente nas células da bainha e do mesofilo. Em substratos ricos em metais essenciais, para manter a homeostase celular, as plantas podem sequestrar o excesso desses metais nos vacúolos (Hall, 2002), na parede celular (Memmon et al., 2001), nas células da epiderme, do mesofilo e nos tricomas (Rascio e Navari-Izzo, 2011). O excesso de ferro pode ser precipitado nos vacúolos, mitocôndrias e espaço apoplasto (Hall, 2002). Nesse trabalho, não foi avaliado em qual estrutura celular o ferro foi compartimentalizado, sendo essa informação fundamental em estudos futuros para melhor entendimento do comportamento dessas espécies quando expostas ao excesso de ferro.

Apesar de acumular elevados teores de ferro nos tecidos, *P. urvillei* e *S. parviflora* não apresentaram sintomas visuais e anatômicos severos. As espécies estudadas apresentaram sintomas anatômicos e visuais semelhantes quando expostas ao excesso de ferro. Porém *P. urvillei* mostrou danos mais intensos do que *S. parviflora*, acumulando, na maior concentração de ferro em solução hidropônica, maior teor de ferro na parte aérea.

5. Referência Bibliográfica

- Aguiar, T.V.; Sant'Anna-Santos, B.F.; Azevedo, A.A.; Ferreira, R.S. (2007) Anati quanti: software de análises quantitativas para estudos em anatomia vegetal. *Planta Daninha*, 25: 649-659.
- Araujo, D.M.; Yoshida, M.I.; Carvalho, C.F.; Stapelfeldt, F. (2008) Reciclagem de aminas na flotação de minério de ferro. *REM: Escola de Minas* 61: 455-460.
- Arndt, U.; Flores, F.; Weinstein, L. (1995) *Efeitos do flúor sobre as plantas: diagnose de danos na vegetação do Brasil*. Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Batalha, M.A.; Mantovani, W. (1999) Chave de identificação baseada em caracteres vegetativos para as espécies vasculares do cerrado na arie pé-de-gigante (Santa Rita do Passa Quatro, SP). *Revista Brasileira de Florestal*, 11: 137-158.
- Becker, M.; Asch, F. (2005) Iron toxicity in rice conditions and management concepts. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 168: 558–573.
- Carneiro, D.A.; Gariglio, L.P. (2010) A biorremediação como ferramenta para a descontaminação de ambientes terrestres e aquáticos. *Revista Tecer*, 3: 82-95.
- Castro, L.N. (2010) *Avaliação ecofisiológicas do impacto causado pelo areosol marinho e pela deposição de ferro particulado em Eugenia uniflora L. (Myrtaceae)*. Dissertação de mestrado: Universidade Federal de Viçosa. 58p.
- Chen, C.C.; Dixon, J.B.; Turner, F.T. (1980) Iron coatings on rice roots: morphology and models of development. *Soil Science Society of America Journal*, 44: 1113- 1119.
- Clemens, S.; Palmgren, M.G.; Krämer, U. (2002) A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation. *TRENDS in Plant Science*, 7:309-315.
- Connolly, E.L.; Guerinot, M.L. (2002) Iron stress in plants. *Genome Biology*, 3: 1024.1–1024.4.
- Coutinho, H.D.; Barbosa, A.R. (2007) Fitorremediação: Considerações Gerais e Características de Utilização. *Silva Lusitana*, 15: 103 – 117.
- Dickison, W.G. (2000). *Integrative Plant Anatomy*. San Diego: Academic Press.
- Evans, D.E. (2003) Aerenchyma formation. *New Phytologist*, 161: 35-49.
- Hall, J.L. (2002) Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 53(366): 1-11.
- Hell, R.; Stephan, U.W. (2003) Iron uptake, trafficking and homeostasis in plants. *Planta*, 216: 541–551.

Jung, C.; Maeder, V.; Funk, F.; Frey, B.; Sticher, H.; Frossard, E. (2003) Release of phenols from *Lupinus albus* L. roots exposed to Cu and their possible role in Cu detoxification. *Plant and Soil*, 252: 301–312.

Karnovsky, M.J. (1965) A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *Journal of Cell Biology*, 27: 137-138.

Kuki, K.N.; Oliva, M.A.; Pereira, E.G. (2008) Iron ore industry emissions as a potential ecological risk factor for tropical coastal vegetation. *Environmental Management*, 42: 111-121.

Lux, A.; Sotnikova, A.; Opatrna, J.; Greger, M. (2004) Differences in structure of adventitious roots in *Salix* clones with contrasting characteristics of cadmium accumulation and sensitivity. *Physiologia Plantarum*, 120: 537-545.

Macnair, M.R. (1993) Tansley Review No. 49: The genetics of metal tolerance in vascular plants. *New Phytologist*, 124: 541-559.

Marschner, H. (1995) *Mineral nutrition of higher plant*. 2.ed. New York: Academic Press. 889p.

Hoagland, D.R.; Arnon, D.I. (1950) The waterculture method for growing plants without soil. *Berkeley: California Agricultural Experiment Station*, 32 p.

Meguro, R., Asano, Y., Odagiri, S., Li, C., Iwatsuki, H., Shoumura, K., 2007. Nonheme-iron histochemistry for light and electron microscopy: a historical, theoretical and technical review. *Archives Histology and Cytology*, 70, 1–19.

Memmon, A.; Aktoprakligil, D.; Özdemir, A.; Vertii, A. (2001) Heavy metal accumulation and detoxification mechanisms in plants. *Turkish Journal of Botany*, 25: 111-121.

Michalak, A. (2006) Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress. *Polish Journal of Environmental Studies*, 15: 523-530.

Milner, M.J.; Kochian, L.V. (2008) Investigating Heavy-metal Hyperaccumulation using *Thlaspi caerulescens* as a Model System. *Annals of Botany*, 102: 3–13.

Müller, C. (2011) *Ação do excesso de ferro sobre os processos e componentes fotossintéticos e o mecanismo de dissipação de energia em arroz*. Tese de doutorado: Universidade Federal de Viçosa, 124p.

Pereira, E.G.; Oliva, M.A.; Kuki, K.N.; Cambraia, J. (2009) Photosynthetic changes and oxidative stress caused by iron ore dust deposition in the tropical CAM tree *Clusia hilariana*. *Trees*, 23:277–285.

Pilon-Smits, E. (2005) Phytoremediation. *Annual Review of Plant Biology*, 56:15-39.

Rascio, N.; Navari-Izzo, F. (2011) Heavy metal hyperaccumulating plants: How and why do they do it? And what makes them so interesting? *Plant Science*, 180: 169–181.

Ravet, K.; Touraine, B.; Boucherez, J.; Briat, J.; Gaymard, F.; Cellier, F. (2009) Ferritins control interaction between iron homeostasis and oxidative stress in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 57: 400–412.

Sant'Anna-Santos, B.F., Silva, L.C., Azevedo, A.A., Araújo, J.M., Alves, E.F., Silva, A.M., Aguiar, R. (2006) Effects of simulated acid rain on the foliar micromorphology and anatomy of tree tropical species. *Environment Experimental of Botany*, 58:158–168.

Sant'Anna-Santos, B.F. & Azevedo, A.A. (2007) Aspectos morfoanatomicos da fitotoxidez do flúor em duas espécies tropicais. *Revista Brasileira de Biociências*, 5: 48-50.

Schützendübel, A.; Polle, A. (2002) Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *Journal of Experimental Botany*, 53: 1351-1365.

Silva, L.C.; Azevedo, A.A.; Silva, E.A.M.; Oliva, M.A. (2000) Flúor em chuva simulada: sintomatologia e efeitos sobre a estrutura foliar e o crescimento de plantas arboreas. *Revista Brasileira de Botânica*, 23: 383-391.

Silva, L.C., Oliva, M.A., Azevedo, A.A., Araújo, J.M., Aguiar, R.M. (2005) Micromorphological and anatomical alterations caused by simulated acid rain in restinga plants: *Eugenia uniflora* and *Clusia hilariana*. *Water Air Soil Pollution*, 168:129–143.

Silva, L.C.; Oliva, M.A.; Azevedo, A.A.; Araújo, J.M. (2006) Responses of restinga plant species to pollution from an iron pelletization factory. *Water, Air and Soil Pollution*, 175: 241-256.

Silva, L.C. ; Azevedo, A. A. (2007) Anatomia de plantas de restinga e sua aplicação como ferramenta para a bioindicação. In: Luiz Fernando Tavares Menezes; Fábio Ribeiro Pires; Oberdan José Pereira. (Org.). *Ecossistemas Costeiros do Espírito Santo - Conservação e restauração*. Vitória: EDUFES, p. 213-233.

Sinha, S.; Gupta, M.; Chandra, P. (1997) Oxidative stress induced by iron in *Hydrilla verticillata* (L.f.) royle: response of antioxidants. *Ecotoxicology and Environmental*

Siqueira-Silva, A.I.; Silva, L.C.; Azevedo, A.A.; Oliva, M.A. (2011) Iron plaque formation and morphoanatomy of roots from species of restinga subjected to excess iron. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 78: 265-275.

Snowden, R.E.; Wheeler, B.D. (1995) Chemical changes in selected wetland plant species with increasing Fe supply, with specific reference to root precipitates and Fe tolerance. *New Phytologist*, 131: 503-520.

Zobel, A.M. (1996). Phenolic compounds in defence against air pollution. In: Yunus, M.; IQBAL, M. (Eds.). *Plant responses to air pollution*. Chincester: Jonh Wiley, 545p.

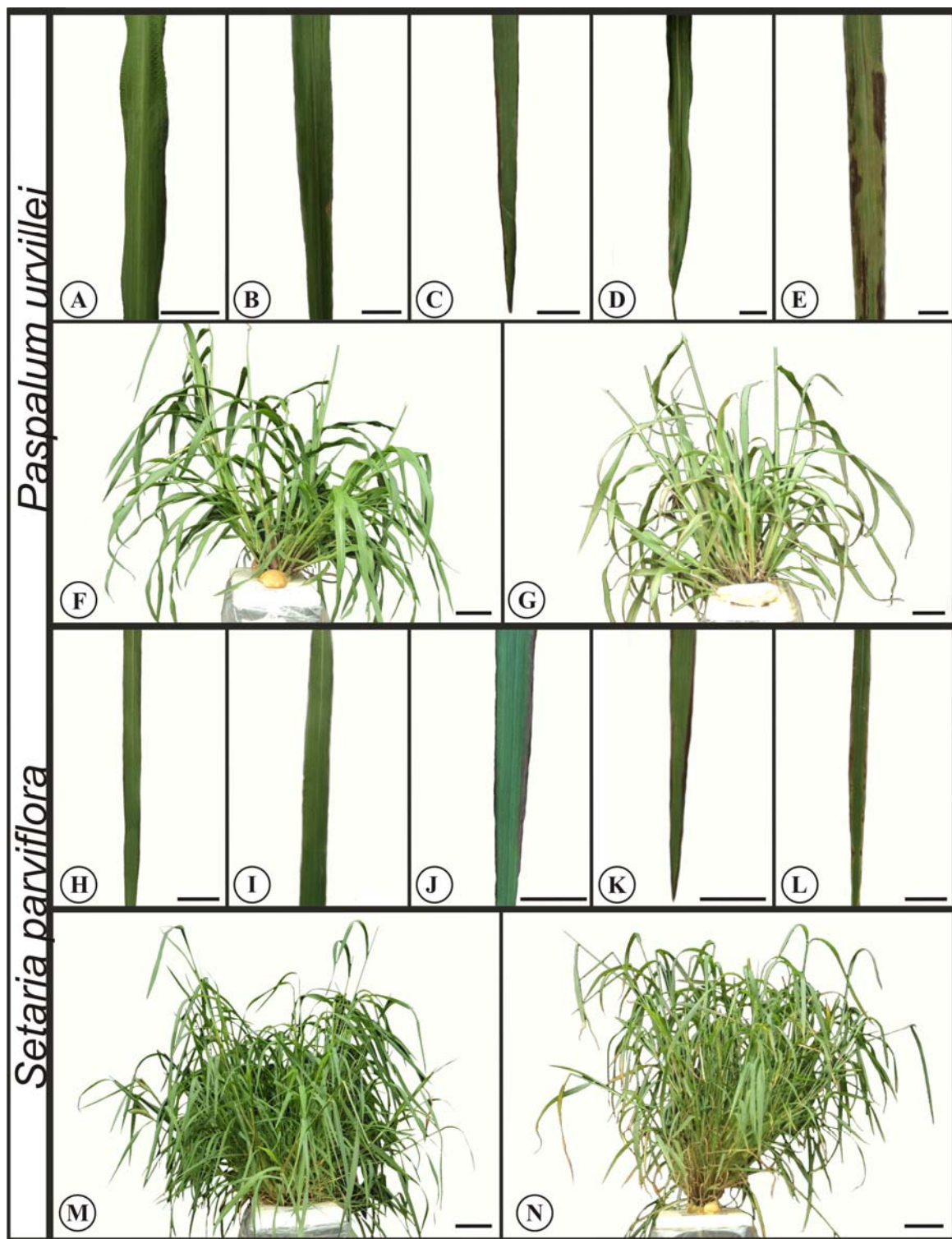


Figura 1. Folhas e parte aérea de *Paspalum urvillei* (A-G) e *Setaria parviflora* (H-N), submetidas a 1 mM (B; I), 2 mM (C; J), 4 mM (D; K), 7 mM (E; G; L; N) de Fe-EDTA. Controle com 0,019 mM de Fe-EDTA (A; F; H; M). Barras: 20 mm (A-E; H-L); 100 mm (F; G; M; N).

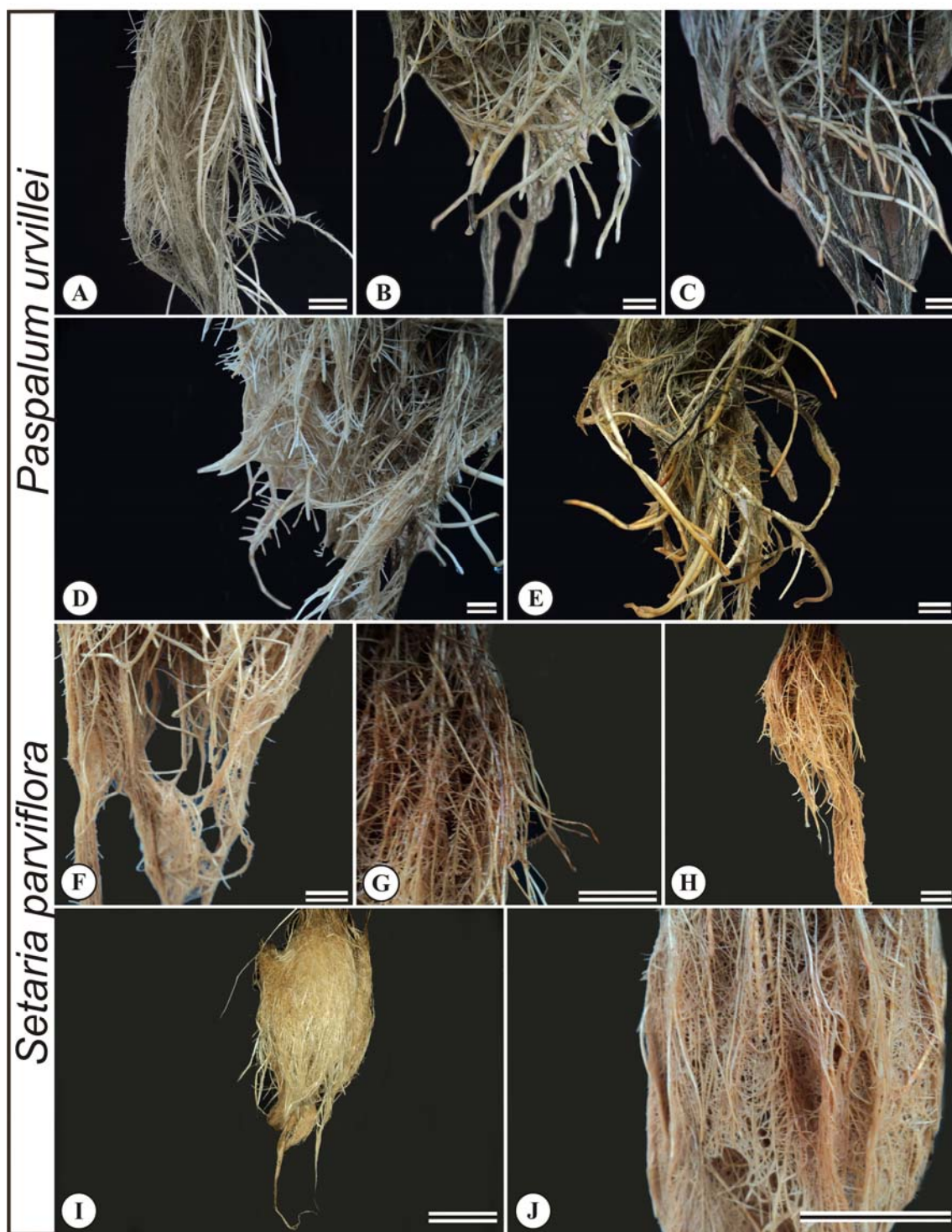


Figura 2. Sistema radicular de *Paspalum urvillei* (A-E) e *Setaria parviflora* (F-J), submetidas a 1 mM (A e F), 2 mM (B e G), 4 mM (C e H) e 7 mM (E e J) de Fe-EDTA. Controle com 0,019 mM de Fe-EDTA (D e I). Barras: (A-E; G-J), 20 mm. (I) 100 mm.

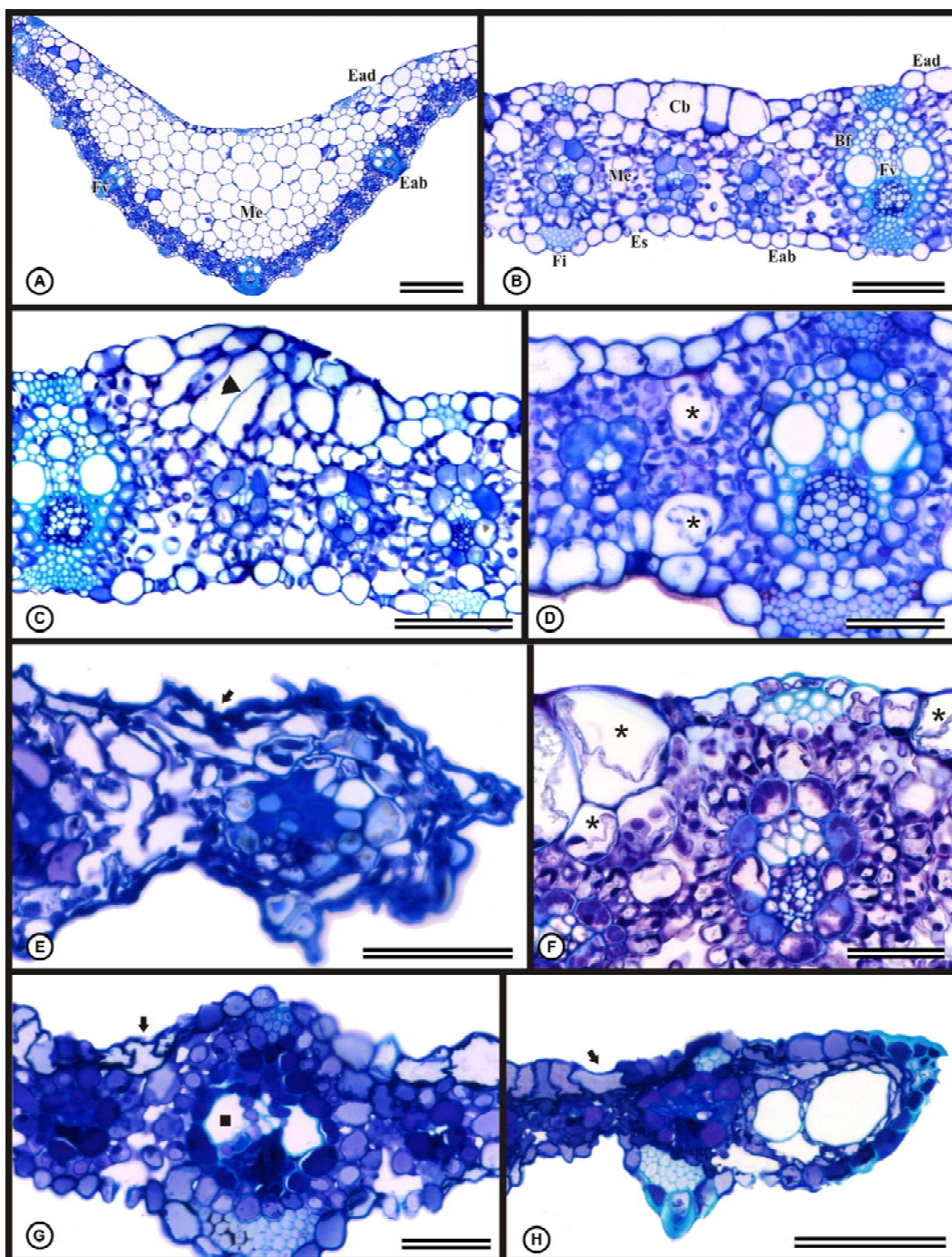


Figura 3. Alterações estruturais da folha de *Paspalum urvillei* submetidas a diferentes concentrações de ferro. (A e B) controle com 0,019 mM de Fe-EDTA. (C), sob 1mM de Fe-EDTA. (D e E), sob 2mM de Fe-EDTA. (F), sob 4mM de Fe-EDTA. (G e H), sob 7mM de Fe-EDTA. Legenda: (Ead) epiderme da face adaxial; (Eab) epiderme da face abaxial; (Fv) feixe vascular; (Me) mesofilo; (Cb) célula buliforme; (Fi) fibra; (Es) estômato; (Bf) bainha do feixe; (*) retração do protoplasto; (Seta) alteração no formato celular; (Triângulo) hiperplasia; (Quadrado) alteração no formato celular do elemento de vaso. Barras: (A) 300µm, (B-D; G-H) 100 µm, (E e F) 50 µm.

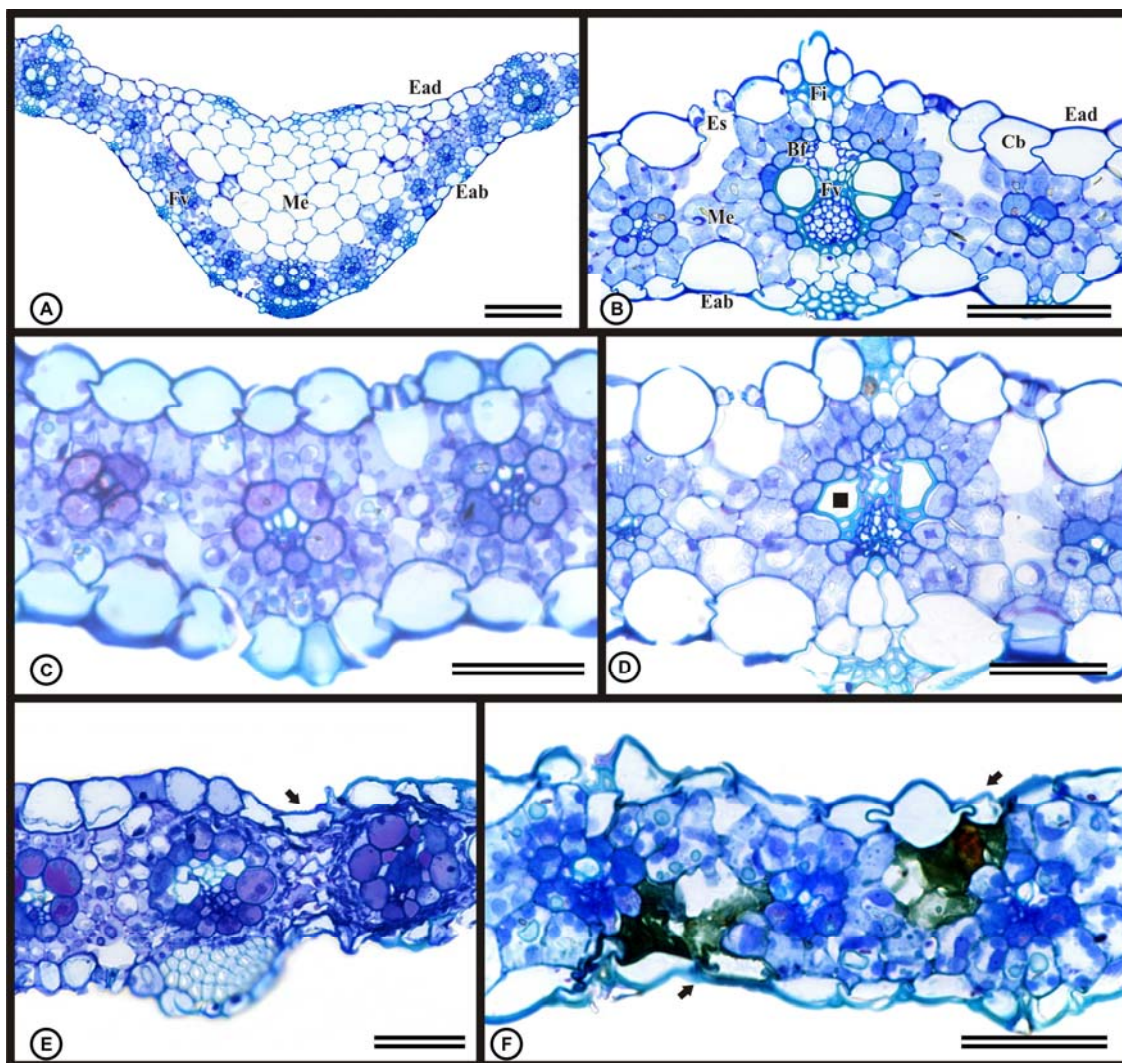


Figura 4. Alterações estruturais da folha de *Setaria parviflora* submetidas a diferentes concentrações de ferro. (A e B) controle com 0,019 mM de Fe-EDTA. (C), sob 1mM de Fe-EDTA. (D), sob 2mM de Fe-EDTA. (E), sob 4mM de Fe-EDTA. (F) sob 7mM de Fe-EDTA. Legenda: (Ead) epiderme da face adaxial; (Eab) epiderme da face abaxial; (Fv) feixe vascular; (Me) mesofilo; (Cb) célula buliforme; (Fi) fibra; (Es) estômato; (Bf) bainha do feixe; (Seta) alterações na morfologia das células, (Quadrado) alteração no formato celular do elemento de vaso. Barras: (A) 300µm, (B) 100µm, (C) 50µm (D) 100µm, (E) 50µm.

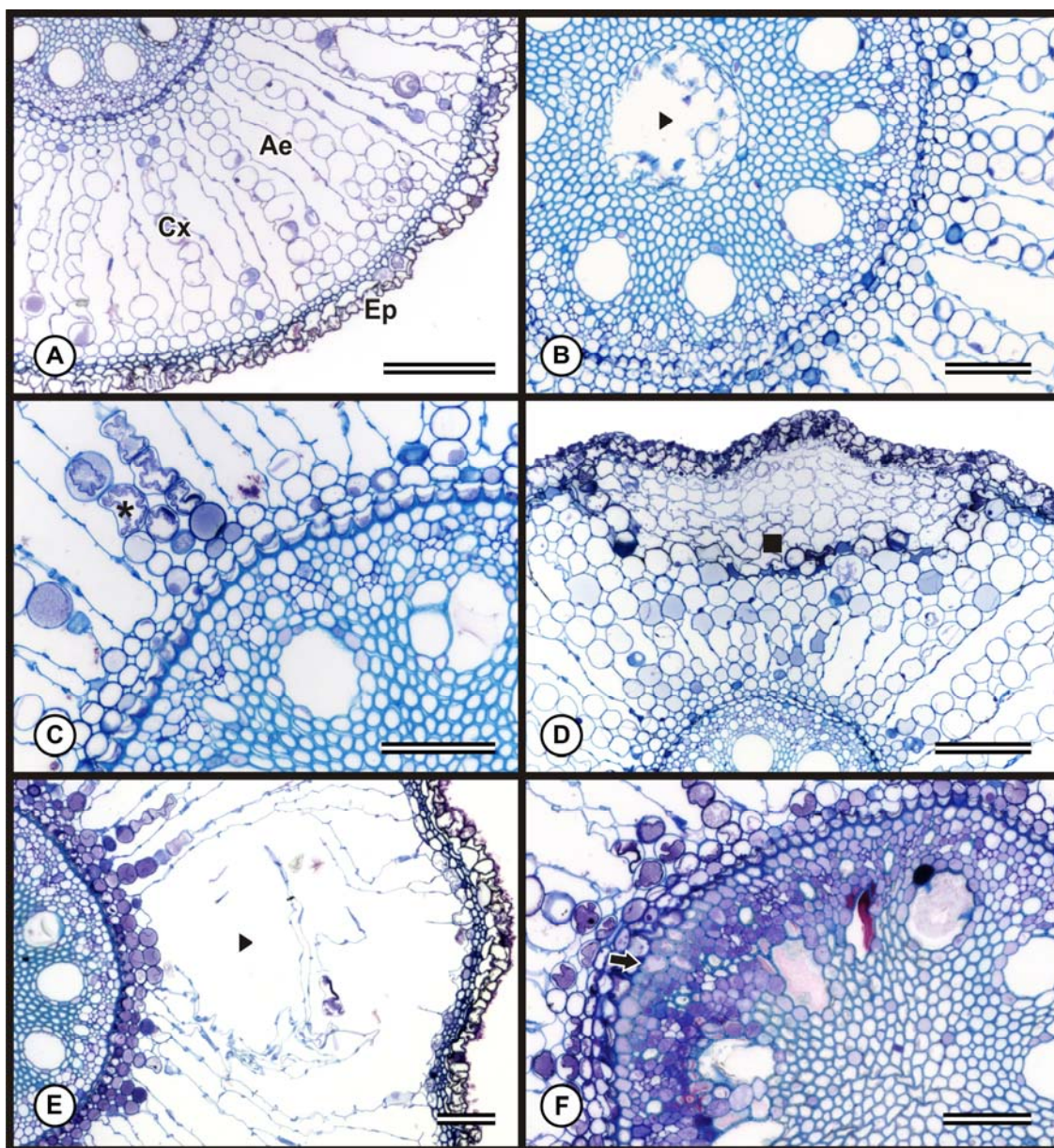


Figura 5. Raízes de *Paspalum urvillei*. (A), controle com 0,019 mM de Fe-EDTA. (B), sob 1mM de Fe-EDTA. (C), sob 2mM de Fe-EDTA. (D), sob 4mM de Fe-EDTA. (E e F), sob 7mM de Fe-EDTA. Legenda: (Ep) epiderme; (Cx) cilindro vascular; (Ae) aerênquima; (Xi) xilema; (Px) protoxilema; (Fl) floema. (*) retração do protoplasto; (Seta) alteração no formato celular; (Triângulo) colapso celular; (Quadrado) tecido de cicatrização. Barras: (A e D) 200μm, (B e C; E e F) 100μm.

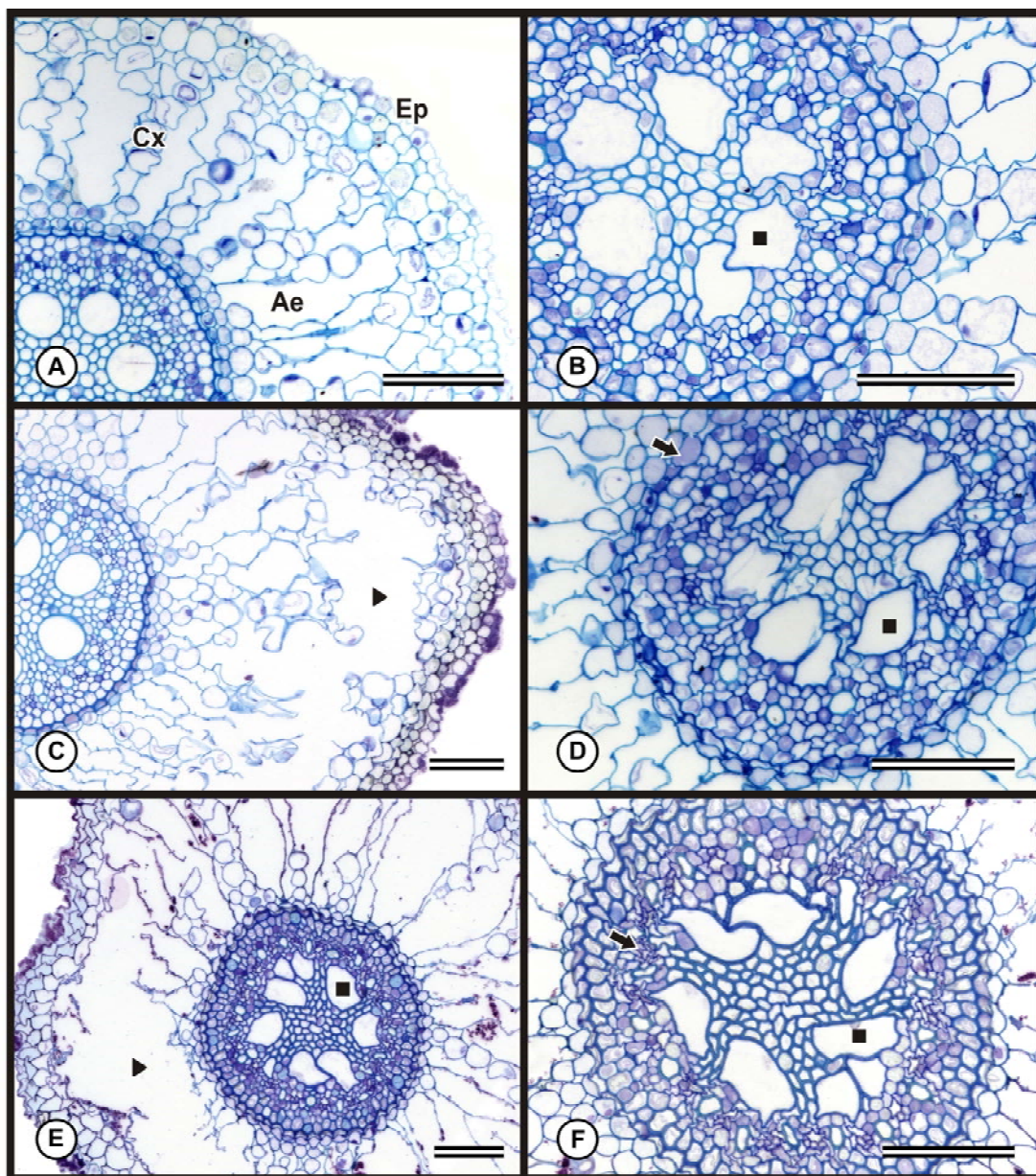


Figura 6. Raízes de *Setaria parviflora*. (A), controle com 0,019 mM de Fe-EDTA. (B), sob 1mM de Fe-EDTA. (C), sob 2mM de Fe-EDTA. (D), sob 4mM de Fe-EDTA. (E e F), sob 7mM de Fe-EDTA. Legenda: (Ep) epiderme; (Cx) cilindro vascular; (Ae) aerênquima; (Xi) xilema; (Px) protoxilema; (Fl) floema. (Seta) alteração no formato celular; (Triângulo) colapso celular; (Quadrado) alteração no formato celular do elemento de vaso. Barras: (A-F) 100µm.

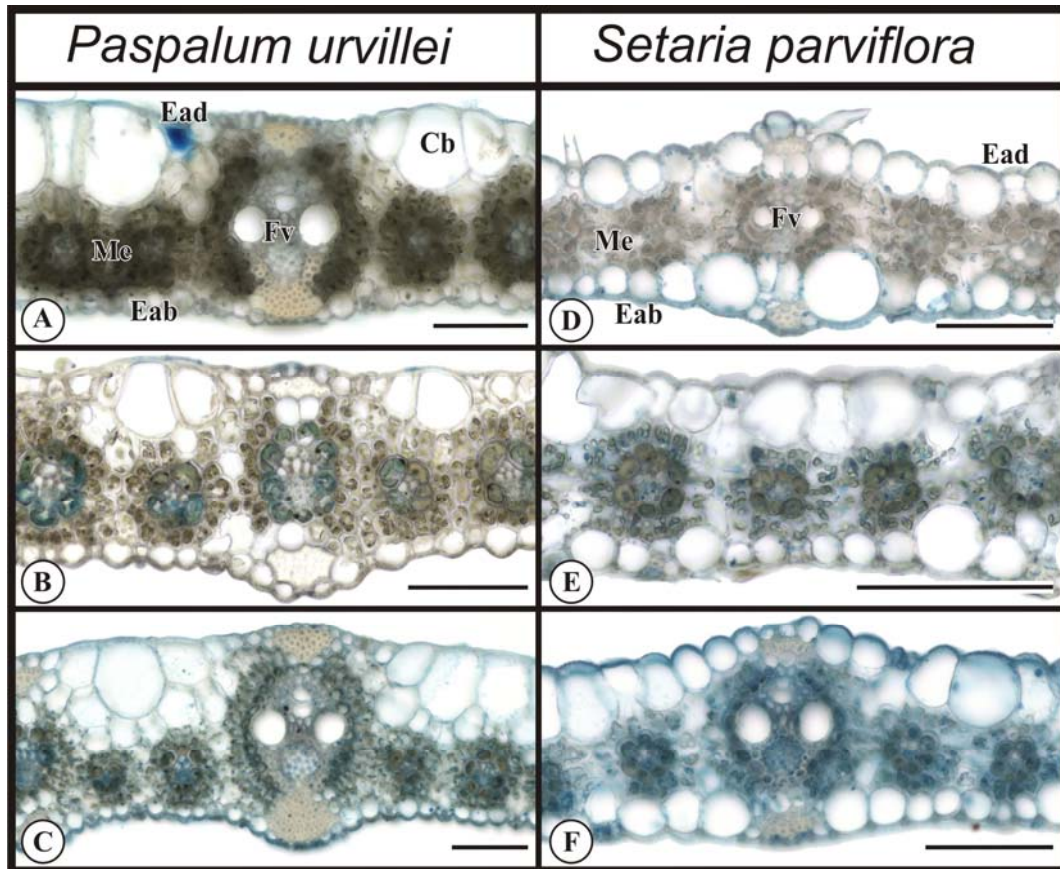


Figura 7. Folhas de *Paspalum urvillei* (A-C) e *Setaria parviflora* (D-F), sob 7 mM com 24h (B; E) e 48h (C; F) de Fe-EDTA. Controle com 0,019 mM de Fe-EDTA (A; D). Legenda: (Ead) epiderme da face adaxial; (Eab) epiderme da face abaxial; (Fv) feixe vascular; (Me) mesofilo; (Cb) célula buliforme. Barras: 100µm.

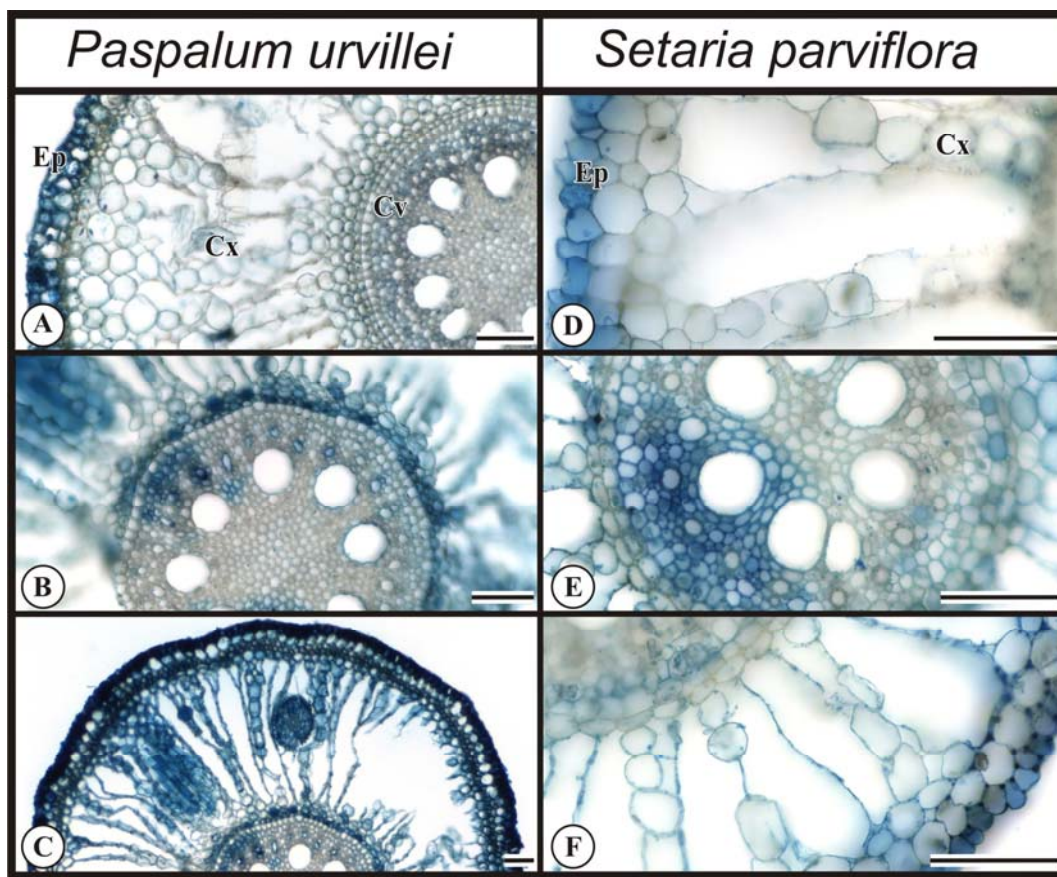


Figura 8. Raízes de *Paspalum urvillei* (A-C) e *Setaria parviflora* (D-F), sob 7 mM com 48h (B; C; E; F) de Fe-EDTA. Controle com 0,019 mM de Fe-EDTA (A e D). Legenda: (Ep) epiderme; (Cx) córtex; (Cx) cilindro vascular. Barras: 100μm.

Tabela 1: Análise micromorfométrica (μm) das folhas de *Setaria parviflora* e *Paspalum urvillei* nos diferentes tratamentos de Fe-EDTA.

Espécie	Fe-EDTA (mM)	Epiderme face adaxial	Epiderme face abaxial	Mesofilo	Bainha do feixe vascular
<i>Setaria parviflora</i>	0,019	91,20	61,15	121,05	23,30
	1	88,52	53,47	114,60	22,28
	2	86,71	48,08	111,84	20,82
	4	85,63	45,86	111,06	20,18
	7	90,53	47,19	106,57	19,99
<i>Paspalum urvillei</i>	0,019	139,44	39,96	179,97	32,93
	1	120,77	38,63	166,14	29,70
	2	128,78	35,85	178,98	29,34
	4	134,39	38,28	181,80	29,71
	7	123,07	37,62	177,76	30,83
Fe-EDTA (Fe)		n.s.	*	n.s.	*
Espécie (Esp)		*	*	*	*
Fe X Esp		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Bloco		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Médias seguidas por letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. (n.s. = não significativo).

CAPÍTULO 3

Alterações fisiológicas causadas pelo excesso de ferro em duas espécies de gramíneas

RESUMO – A capacidade de uma espécie tolerar um ambiente estressante depende de suas respostas fisiológicas às variações desse ambiente. Portanto, o objetivo desse trabalho foi avaliar as alterações em variáveis fisiológicas causadas pelo excesso de ferro nas espécies *Setaria parviflora* (Poir.) Kerguelen e *Paspalum urvillei* Steudel (Poaceae). Mudas de *S. parviflora* e *P. urvillei* foram cultivadas em solução nutritiva de Hoagland, a meia força iônica em pH 5,0, com constante aeração. As plantas foram submetidas, gradativamente, às diferentes concentrações de Fe^{3+} na solução nutritiva, na forma Fe-EDTA (0,009; 1; 2; 4 e 7 mM). As plantas permaneceram expostas ao tratamento por 20 dias. Foi determinado o teor de pigmentos, as trocas gasosas, a fluorescência da clorofila *a* e a permeabilidade de membrana. Os dados foram submetidos à análise de variância, e as médias, comparadas pelo teste de Tukey, a 5%. Houve aumento significativo de clorofila *a* e carotenóide nas concentrações intermediárias de ferro nas espécies estudadas. *S. parviflora* apresentou menor valor de concentração interna e externa de CO_2 (C_i/C_a) na concentração 2 mM de Fe-EDTA em relação a *P. urvillei*. *P. urvillei* apresentou aumento significativo na taxa aparente de transporte de elétrons (ETR) e no rendimento quântico efetivo do PSII (ϕ_{II}) nas concentrações 2 mM e 4 mM de Fe-EDTA. As espécies estudadas mostraram perfis diferentes quando submetidas ao excesso de ferro. *P. urvillei* apresentou diminuição dos valores de A , F_0 , F_v/F_m e aumento no extravasamento de eletrólitos mais acentuada do que *S. parviflora* na concentração 7 mM de Fe-EDTA. *S. parviflora* apresentou alterações nos valores de assimilação líquida de carbono primeiro do que *P. urvillei* e apresentou, também, maiores valores de dissipação de energética do tipo não-fotoquímica (NPQ). Portanto, entre as espécies estudadas, *S. parviflora* mostrou-se ser mais sensível do que *P. urvillei* quando submetidas ao estresse causado pelo excesso de ferro.

Palavras-chave: *Setaria parviflora*, *Paspalum urvillei*, poluição, teor de pigmentos, trocas gasosas, fluorescência da clorofila *a* e permeabilidade de membrana

1. Introdução

O ferro é considerado um elemento essencial em diversas funções fisiológicas (Jeong e Guerinot, 2009; Hänsch e Mendel, 2009), devido, principalmente, à propriedade redox que permite sua participação no transporte de elétrons em diversos complexos (Becana et al., 1998; Ravet et al., 2009; Nozoye et al., 2011).

Segundo Conte e Walker (2011), dos micronutrientes usados por organismos vivos, o ferro é um dos mais importantes e problemáticos. Quando em excesso, ele pode causar estresse oxidativo através da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) provocando oxidação de proteínas, das membranas lipídicas, danos ao DNA e, conseqüentemente, aos tecidos vegetais (Connolly e Guerinot, 2002; Schützendübel e Polle, 2002).

O aumento de usinas mineradoras no Brasil causa uma crescente emissão de poluentes como o ferro particulado que pode afetar a vegetação ao redor (Silva et al., 2006; Silva e Azevedo, 2007; Kuki et al., 2009). Muitas usinas apresentam lagoas de decantação cuja função primária é receber água de rejeito do sistema de pelotização, inclusive do mineroduto. Assim sendo, existe grande aporte de sólidos não solúveis, dentre eles, grande quantidade de partículas de ferro que são depositadas nessas lagoas. Em Ubu, ES existe uma usina onde a lagoa de decantação é povoada por varias plantas herbáceas, dentre elas gramíneas das espécies *Setaria parviflora* (Poir.) Kerguelen e *Paspalum urvillei* Steudel. Estas gramíneas apresentam metabolismo C4 e são amplamente distribuídas no Brasil (Scheffer-Basso et al., 2002; Mollard e Insausti, 2011).

S. parviflora e *P. urvillei* são espécies que toleram elevados níveis de ferro, acumulando e translocando grande quantidade desse ferro em seus tecidos (resultado apresentado no capítulo 1). A seleção de espécies de plantas que sejam tolerantes a metais pesados, ou que acumulem grande quantidade deles, pode, certamente, facilitar a recuperação de áreas contaminadas (Chehregani et al., 2009).

É importante conhecer as alterações fisiológicas para avaliar minuciosamente a tolerância de uma espécie ao estresse causado pelo poluente. Excesso de ferro tem efeito negativo no metabolismo vegetal (Schützendübel e Polle, 2002). Esse resultado foi observado por Neves et al. (2009) estudando o efeito do excesso de ferro combinado

com chuva ácida na espécie de restinga *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae). Esses autores constataram que altos níveis de ferro nas folhas causaram lesões às membranas celulares, indicando estresse oxidativo, o que teria desencadeado diminuição nos teores de clorofila *a* e nas trocas gasosas. Sob severa toxidez por ferro ocorre danos aos complexos fotossintéticos, redução da eficiência quântica do PSII e da taxa de transporte de elétrons, aumentando os valores da dissipação não-fotoquímica do excesso de energia (Suh et al., 2002; Pereira et al., 2009; Castro, 2010). Além disso, o excesso de ferro pode causar a desestruturação de pigmentos dos complexos fotossintéticos limitando, dessa forma, a capacidade de fixação de carbono nos cloroplastos o que potencializa as alterações na taxa de assimilação líquida de CO₂ (Terry, 1980; Mishra e Dubey, 2005). Müller (2011) em experimento realizado em casa de vegetação, com cultivares de *Oryza sativa* L. encontrou resultados semelhantes aos citados acima. Foi demonstrado que 7 mM de sulfato ferroso com EDTA em sistema hidropônico durante aproximadamente 30 dias causou redução de 77% na taxa de assimilação líquida de carbono e aumento de 188% na estimativa dos centros de reações abertos no FSII no cultivar BRS Atalanta quando comparadas as plantas do tratamento controle. A autora concluiu que a redução na taxa fotossintética ocorreu devido à ineficiência na compartimentalização do excesso de ferro. Este fator provocou aumento da dissipação na forma de calor, devido à disparidade na transferência de energia dos pigmentos dos complexos coletor de luz para o centro de reação.

As espécies *S. parviflora* e *P. urvillei* acumulam altos níveis de ferro na parte aérea e nas raízes utilizando estratégias que mantêm seu crescimento estável (resultado do capítulo 1). A capacidade de uma espécie tolerar um ambiente estressante depende de suas respostas fisiológicas às variações desse ambiente. Portanto, o objetivo desse trabalho foi avaliar as alterações nas variáveis fisiológicas causadas pelo excesso de ferro nas espécies *Setaria parviflora* (Poir.) Kerguelen e *Paspalum urvillei* Steudel (Poaceae).

2. Material e Métodos

2.1 Condições de cultivo e aplicação dos tratamentos

O experimento foi conduzido em casa de vegetação da Universidade Federal de Viçosa, MG, Brasil (649 m altura, 20°45'20" S e 42°52'40" N). Indivíduos das espécies

Setaria parviflora (Poir.) Kerguelen e *Paspalum urvillei* Steudel (Poaceae) foram coletados na margem da lagoa de decantação de uma usina de pelotização de minério de ferro localizado em Ubu (ES). A identidade das espécies foi confirmada pela especialista Hilda Maria Longhi Wagner (Universidade Federal do Rio Grande do Sul).

Inicialmente, as mudas foram cultivadas em vasos plásticos de oito litros contendo terra como substrato por, aproximadamente, 90 dias. Posteriormente, touceiras de cada espécie foram padronizadas visualmente e transferidas para caixas de isopor de 5 litros, separando-se uma touceira por caixa. As touceiras foram mantidas em solução nutritiva de Hoagland (Hoagland e Arnon, 1950), a meia força iônica em pH 5,0, com constante aeração. A solução hidropônica era constituída de 0,5mM $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, 3mM KNO_3 , 2mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 1mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 23,13 μM H_3BO_3 , 4,57 μM $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,382 μM $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,16 μM $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,0695 μM MoO_3 e 9 μM Fe-EDTA. Essa solução foi renovada semanalmente, sendo seu volume completado com água deionizada sempre que necessário e o pH, ajustado para 5,0 a cada 2 dias usando NaOH ou HCl. Nesse período de aclimação, as plantas foram cortadas na altura do colmo duas vezes para padronização antes da aplicação dos tratamentos.

As plantas foram submetidas, gradativamente, às diferentes concentrações de Fe^{3+} na solução nutritiva, na forma Fe-EDTA (0,009; 1; 2; 4 e 7 mM). A solução foi trocada a cada 12 horas, com o incremento de 0,25mM de Fe-EDTA até chegar em 1 mM de Fe-EDTA. Após isso, o incremento foi de 2, 4 e 7 mM de Fe-EDTA até obtenção das concentrações finais de ferro.

Após o estabelecimento das concentrações finais, a solução nutritiva era trocada a cada 3 dias, e o pH, ajustado diariamente para 5,0 usando NaOH ou HCl. Após a aclimação, as plantas permaneceram expostas aos tratamentos por 20 dias.

Ao final do experimento, foram avaliados os teores de clorofila *a*, *b* e carotenóides, as trocas gasosas, a fluorescência da clorofila *a* e a permeabilidade de membranas.

2.2 Teores de clorofila *a*, *b* e carotenóides

Os teores de clorofila *a*, clorofila *b* e carotenóides foram determinados com a utilização de dimetilsulfóxido (DMSO) como extrator (Wellburn, 1994). Seis discos de folhas completamente expandidas, a partir do 2º nó, de 5 mm de diâmetro de cada repetição foram colocados em recipientes contendo 4ml de DMSO saturado com

carbonato de cálcio. Após 24 horas em banho-maria a 65°C os valores de absorbâncias do extrato ($A_{663,2}$ e $A_{646,8}$ para clorofilas *a* e *b*, respectivamente e A_{470} para carotenóides) foram lidas em espectrofotômetro Genesys 2 PC (Thermo Spectronic, Rochester, USA). Os teores dos pigmentos determinados foram expressos em $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$.

2.3 Determinação das trocas gasosas

Foram determinadas as trocas gasosas utilizando-se um medidor portátil LI-6400 (IRGA, LI-COR Biosciences Inc., Nebraska, USA) equipado com fonte de azul/vermelho modelo LI-6400-02B (LI-COR). As leituras de trocas gasosas foram feitas em uma folha completamente expandida de cada repetição em todos os tratamentos. Foram avaliadas as seguintes variáveis: taxas de assimilação fotossintética líquida de CO_2 (A , $\mu\text{molCO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$), a condutância estomática (g_s , $\text{molH}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$), a taxa transpiratória (E , $\text{mmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) e a razão entre concentração interna e externa de CO_2 (C_i/C_a , $\mu\text{molCO}_2 \text{ m}^{-1}$). As medições foram realizadas entre 8:00 e 12:00 a.m, com intensidade luminosa de $1500 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

2.4 Fluorescência da Clorofila *a*

Foram realizadas medições das variáveis de fluorescência da clorofila *a* com o auxílio do IRGA (LI-6400xt, LI-COR Biosciences Inc., Nebraska, USA) com fluorômetro acoplado, na mesma área foliar em que foram realizadas as medições das trocas gasosas.

As folhas foram adaptadas ao escuro na noite anterior à leitura, para que os centros de reação estivessem completamente abertos (aceptores primários oxidados). Foi aferida a fluorescência inicial (F_0) e a fluorescência máxima (F_m). A partir desses valores, foi calculado a eficiência quântica máxima do fotossistema II (F_v/F_m , onde $F_v = F_m - F_0$).

Após a aplicação de uma iluminação actínica de 0,8 segundos e um pulso de luz actínica saturante foi avaliada a fluorescência na amostra adaptada à luz antes do pulso de saturação (F) e fluorescência máxima na amostra adaptada à luz (F_m'). A partir desses resultados foi possível calcular a fluorescência mínima da folha na região iluminada, segundo a fórmula: $F_0' = F_0 / [((F_m - F_0)/F_m) + (F_0/F_m')]$ (Oxborough e Baker, 1997). O rendimento quântico efetivo do PSII na folha iluminada foi determinada segundo Genty et al. (1989) usando a fórmula: $\phi_{II} = \Delta F/F_m' = (F_m' - F)/F_m'$.

Foi calculado, também, o coeficiente de extinção fotoquímico pela fórmula $q_L = (F_m' - F) / (F_m' - F_0)(F_0' / F)$ (Kramer et al., 2004). A taxa aparente de transporte de elétrons foi calculada segundo Bilger et al (1995), $ETR = \phi_{II} \cdot PAR \cdot 0,84 \cdot 0,5$, onde $\phi_{II} = (F_m' - F) / F_m'$; PAR é o fluxo de fótons ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) incidente sobre a folha; 0,5 é o valor correspondente à fração de energia de excitação distribuída para o FSII; 0,84 corresponde a fração de luz incidente que é absorvida pelas folhas. O *quenching* não fotoquímico foi calculado segundo a fórmula, $NPQ = F_m - F_m' / F_m'$ (Bilger e Björkman, 1990).

2.5 Permeabilidade de membrana

Para avaliar a permeabilidade das membranas celulares (extravasamento de eletrólitos) foi seguida a metodologia de McCann e Solomon (2000). De acordo com o peso fresco dos discos foliares das espécies estudadas, foi estabelecido 15 discos foliares de 5 mm de diâmetro de folhas totalmente expandidas de *S. parviflora* e 10 discos foliares para *P. urvillei*. Os discos foram lavados três vezes com água deionizada, em placa de Petri contendo 15 mL de água destilada. Foi medida a condutividade elétrica inicial da água (C_i). As placas foram levadas a estufa (90°C) e após 6 horas, foi medida a condutividade elétrica final da água (C_f). Os valores de extravasamento de eletrólito (%) foram calculados segundo a fórmula: $C_i / C_f \times 100$ (McCann e Solomon, 2000).

2.6 Análise estatística

O delineamento experimental foi o de blocos casualizados, com quatro repetições por tratamento. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), e as médias, comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. As análises foram realizadas com o uso do programa estatístico SAEG 9.0 UFV (Euclides, 2004).

3. Resultados

3.1 Teor de clorofila *a*, *b* e carotenóides

A resposta das duas espécies foi semelhante em relação aos teores de clorofila *a* e carotenóides (Tab. 1). Apesar das duas espécies apresentarem no tratamento controle valores de concentração de ferro foliar similares, no tratamento 7 mM de Fe-EDTA ocorreu uma disparidade nas respectivas concentrações. Entre as espécies, *P. urvillei*

acumulou maior teor de ferro na concentração 7 mM de Fe-EDTA, entretanto, apresentou menor variação de clorofila *a* e carotenóides em relação ao controle.

Houve aumento significativo de clorofila *a* e carotenóides nas concentrações intermediárias de ferro (1, 2, 4 mM de Fe-EDTA) em comparação ao tratamento controle. Em *S. parviflora*, na concentração 7 mM de Fe-EDTA, foi verificada menor média de clorofila *a* e carotenóides, entretanto, não diferiu do tratamento controle, apenas dos tratamentos intermediários. *S. parviflora* apresentou maiores teores de clorofila *a* e carotenóides em relação a *P. urvillei*. Não foi observada diferença estatística nos valores de clorofila *b* nas duas espécies.

3.2 Avaliação das trocas gasosas

Foi observada diferença significativa para a taxa fotossintética (*A*) apenas em resposta aos tratamentos de Fe-EDTA (Tab. 2). *S. parviflora* apresentou os maiores valores de taxa fotossintética, com exceção da concentração 4 mM de Fe-EDTA no qual essa espécie mostrou um declínio em relação a *P. urvillei* (Fig.1A). *S. parviflora* apresentou redução de *A* em concentrações maiores do que 2 mM de Fe-EDTA e a redução em *P. urvillei* ocorreu na concentração 7 mM de Fe-EDTA.

Para as duas espécies, em relação à condutância estomática (*g_s*), não foi observado diferença estatística entre o tratamento de Fe-EDTA, as espécies e entre a interação do tratamento com as espécies (Fig.1B).

S. parviflora apresentou maiores valores de taxa de transpiração (*E*) em relação a *P. urvillei* (Fig.1C), sendo observada diferença estatística apenas entre as espécies (Tab. 2).

O poluente afetou a razão entre a concentração interna e externa de CO₂ (*C_i/C_a*) nas duas espécies (Tab. 2). Houve menor razão *C_i/C_a* em *P. urvillei* no tratamento 2 mM de Fe-EDTA (Fig.1D).

3.3 Fluorescência da Clorofila *a*

P. urvillei apresentou maiores valores de fluorescência mínima (*F₀*), em todos os tratamentos, em relação a *S. parviflora*. Nas duas espécies, em relação ao tratamento de Fe-EDTA, foi observado redução significativa nos valores de (*F₀*) e do coeficiente de extinção fotoquímico (*q_L*) nas concentrações 7 mM e 1mM de Fe-EDTA, respectivamente (Fig.2A; F) (Tab.03).

P. urvillei apresentou maior eficiência quântica máxima do PSII (F_v/F_m) em relação a *S. parviflora*. Foi observada redução significativa nos valores de F_v/F_m em *P. urvillei* exposto a concentração 7 mM de Fe-EDTA.

S. parviflora não apresentou alterações em resposta ao excesso de ferro para todas as variáveis avaliadas, com exceção da eficiência quântica máxima do PSII onde houve redução significativa quando exposta a concentração de 7 mM de Fe-EDTA (Fig. 2B).

P. urvillei apresentou aumento significativo na taxa aparente de transporte de elétrons (ETR) e no rendimento quântico efetivo do PSII (ϕ_{II}) nas concentrações 2 mM e 4 mM de Fe-EDTA (Fig. 2C; D).

Em relação a *P. urvillei*, *S. parviflora* apresentou maiores valores do *quenching* não-fotoquímico (NPQ) e fotoquímico (q_L) com exceção da concentração 1 mM e 4 mM de Fe-EDTA, respectivamente (Fig 2E - 2F). O NPQ diferiu significativamente apenas em relação às espécies (Tab. 3).

3.4 Permeabilidade de membrana

P. urvillei apresentou valores de extravasamento de eletrólitos estatisticamente superiores ao encontrado por *S. parviflora* na concentração 4 e 7 mM de Fe-EDTA. Para a espécie *P. urvillei*, ocorreu aumento significativo de extravasamento de eletrólitos apenas na concentração 7 mM de Fe-EDTA (Fig. 3). Esse aumento correspondeu a aproximadamente 40% do valor observado no tratamento controle.

S. parviflora apresentou redução de extravasamento de eletrólito na concentração 4 mM em relação a 7 mM de Fe-EDTA, mas não diferem do controle, 1 mM e 3 mM de Fe-EDTA (Fig. 3).

4. Discussão

Nas concentrações intermediárias, o teor de ferro na parte aérea foi alto, porém, não considerado acima do nível crítico para toxicidade de ferro (500 mg Fe/Kg) (Marschner, 1995). Como mais de 90% do teor de ferro nas folhas se localizam nos cloroplastos (Terry e Abadia, 1986), o excesso desse elemento não tóxico à planta pode ter contribuído para o aumento do conteúdo de clorofila *a*. Além disso, nas concentrações intermediárias de *P. urvillei* também foi observado aumento de ETR e do ϕ_{II} . Aumento do teor de clorofila também foi observado por outros autores, como Kampfenkel et al.

(1995) que estudaram os efeitos do excesso de ferro em plantas de *Nicotiana plumbaginifolia* e Pereira (2006) que, estudando os efeitos causados pela deposição de ferro particulado em *Clusia hilariana*, observou aumento do conteúdo de pigmentos nas folhas jovens dessa espécie. Nas folhas completamente expandidas, entretanto, o autor encontrou decréscimo nos valores desses pigmentos.

Trabalhos que relataram o teor de pigmentos em plantas expostas ao excesso de ferro mostram resultados variados na literatura. Alguns trabalhos não relatam mudanças nos valores de clorofila nas espécies estudadas. É o caso do trabalho de Sinha et al. (1997) que estudaram o estresse oxidativo induzido pelo ferro em *Hydrilla verticillata* (L.f.) Royle e de Oliveira et al. (2007) que analisaram o efeito do material particulado de ferro no teor de pigmentos de *Schinus terebinthifolius* Raddi localizadas próxima a uma usina mineradora e a uma unidade de conservação. Outros trabalhos relataram diminuição nos valores de clorofila em plantas expostas ao excesso de ferro. Essa diminuição, em alguns casos, foi atribuída à formação de radicais livres nos cloroplastos causando a degradação desses pigmentos (Fan e Wang, 2000; Monni et al., 2001). Na concentração 7 mM de Fe-EDTA ocorreu redução no teor de clorofila *a*, em relação as concentrações intermediárias, e danos resultantes do estresse oxidativo, evidenciado pelos elevados valores de extravasamento de eletrólitos em *P. urvillei*. Este fato mostra que, nessa espécie, o estresse oxidativo provocado pelo excesso de ferro foi responsável pela perda no teor desses pigmentos.

Apesar de não ocorrer diferença estatística nos valores de condutância estomática (g_s) em relação ao excesso de ferro nas duas espécies estudadas, foi observado queda na taxa fotossintética (*A*) na concentração 4 mM e 7 mM de Fe-EDTA para *S. parviflora* e *P. urvillei*, respectivamente. Neste caso, essa redução na taxa fotossintética pode indicar limitações bioquímicas ou fotoquímicas.

Em relação à limitação bioquímica, para as espécies estudadas, ocorreu aumento na razão da concentração interna e externa de CO_2 (C_i/C_a) nas mesmas concentrações em que ocorreu queda na taxa fotossintética. Isto indica limitações na fixação de CO_2 pelas plantas, que podem ser melhor explicadas por análises enzimáticas, por exemplo a atividade da Rubisco. Neste trabalho, não foram avaliadas as atividades de enzimas, sendo fundamental sua avaliação em estudos futuros. Cultivares de *Oryza sativa* L.

cultivados em hidroponia com 7 mM de sulfato ferroso com EDTA também mostraram limitações bioquímicas evidenciadas pela redução na fotossíntese e aumento das concentrações internas de CO₂ (Müller, 2011). Nesse estudo, essa limitação bioquímica pôde ser comprovada pela redução na taxa máxima de carboxilação da enzima Rubisco, que reduz devido a degradação da subunidade maior da Rubisco por espécies reativas de oxigênio (Desimone et al., 1996). Foi observada limitação fotoquímica, comprovada pela redução significativa nos valores de F_0 e F_v/F_m na concentração 7 mM de Fe-EDTA nas duas espécies estudadas.

A diminuição da fluorescência mínima (F_0) na concentração 7 mM de Fe-EDTA foi observada nas duas espécies. Porém foi mais acentuada em *P. urvillei*, indicando que essa espécie é mais sensível a alterações causadas pelo ferro na transferência de energia dos pigmentos do complexo antena ao centro de reação. Os valores de F_0 representam a emissão de luz pelas moléculas de clorofila *a* excitadas antes da energia ser dissipada para o centro de reação do PSII (Krause e Weis, 1991).

Em *P. urvillei* a eficiência quântica máxima do PSII (F_v/F_m) no tratamento 7 mM de Fe-EDTA foi de 0,72, indicando a magnitude do estresse. Segundo Bolhàr-Nordenkamp et al. (1989), quando uma planta não está submetida ao estresse, a razão F_v/F_m deve ser entre 0,75 e 0,85. O valor de F_v/F_m é proporcional ao rendimento quântico da fase fotoquímica da fotossíntese. O declínio dessa razão é um bom indicador de dano fotoinibitório sugerindo comprometimento da utilização da energia luminosa sobre o metabolismo do carbono em plantas expostas a estresse (Ögren e Öquist, 1985; Björkman e Demming, 1987). Esse dano fotoinibitório pode ter sido causado pela oxidação de proteínas do complexo fotossintético causado pelo excesso de ferro.

P. urvillei acumulou mais ferro na concentração 7 mM de Fe-EDTA, apresentou redução significativa nos valores de F_0 e F_v/F_m e aumento significativo de extravasamento de eletrólitos. Esses dados confirmam que o estresse causado pelo excesso de ferro pode estar relacionado a um possível estresse oxidativo nessa espécie, através da formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), que resulta em vários distúrbios fisiológicos, como peroxidação da membrana fosfolipídica, e danos aos tecidos vegetais (Becana et al., 1998; Tsai e Huang, 2006). Neste trabalho, não foram

avaliadas as enzimas antioxidativas, sendo fundamental sua avaliação em estudos futuros.

Em *S. parviflora*, os menores valores de NPQ observados, em relação a *P. urvillei*, indicam que esta última apresenta maior eficiência na dissipação de energia do tipo não-fotoquímica, provavelmente influenciada pela presença de zeaxantina, cuja ação fotoprotetora ocorre nos complexos coletores de luz do PSII (Horton et al., 1996; Demmig-Adams e Adams, 2000). Isso indica a provável regulação fotoprotetora possibilitada pela capacidade de dissipação da energia absorvida em excesso pelo aumento do gradiente de prótons entre o lúmen e o estroma do cloroplasto ou pela ação da zeaxantina (Maxwell & Johnson, 2000).

P. urvillei apresentou aumento significativo na taxa de transporte elétrons e no rendimento quântico efetivo do PSII nas concentrações intermediárias de Fe-EDTA (2 e 4 mM de Fe-EDTA). Esse aumento pode ter sido provocado pelo incremento nas moléculas de clorofila *a* que também ocorreu nas concentrações intermediárias dos tratamentos de ferro.

As espécies estudadas mostraram perfis diferentes quando submetidas ao excesso de ferro. *P. urvillei* apresentou diminuição dos valores de A , F_0 , F_v/F_m e aumento no extravasamento de eletrólitos mais acentuada do que *S. parviflora* na concentração 7 mM de Fe-EDTA. *S. parviflora* apresentou alterações nos valores de assimilação líquida de carbono primeiro do que *P. urvillei* e apresentou, também, maiores valores de dissipação de energética do tipo não-fotoquímica (NPQ). Portanto, entre as espécies estudadas, *S. parviflora* mostrou-se ser mais sensível do que *P. urvillei* quando submetidas ao estresse causado pelo excesso de ferro.

5. Referência bibliográfica

Becana, M.; Moran, J.F.; Iturbe-Ormaetxe, I. (1998) Iron-dependent oxygen free radical generation in plants subjected to environmental stress: toxicity and antioxidant protection. *Plant and Soil*, 201: 137–147.

Bilger, W.; Björkman, O. (1990) Role of the xanthophyll cycle in photoprotection elucidated by measurements of light-induced absorbance changes, fluorescence and photosynthesis in leaves of *Hedera canariensis*. *Photosynthesis Research*, 25: 173-185.

Bilger, W.; Schreiber, U.; Bock, M. (1995) Determination of the quantum efficiency of photosystem II and of non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence in the field. *Oecologia*, 102: 425-432.

Björkman, O.; Demming, B. (1987) Photon yield of O₂ evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77 K among vascular plants of diverse origins. *Planta*, 170: 61-66.

Bolhàr-Nordenkamp, H.R.; Long, S.P.; Baker, N.R.; Öquist, G.; Schreiber, U.; Lechner, E.G. (1989) Chlorophyll fluorescence as probe of the photosynthetic competence of leaves in the field: a review of current instrument. *Functional Ecology*, 3: 497-514.

Castro, L.N. (2010) *Avaliações ecofisiológicas do impacto causado pelo areosol marinho e pela deposição de ferro particulado em Eugenia uniflora L. (Myrtaceae)*. Dissertação de mestrado: Universidade Federal de Viçosa. 58p.

Chehregani, A.; Noori, M.; Yazdi, H.L. (2009) Phytoremediation of heavy-metal-polluted soils: Screening for new accumulator plants in Angouran mine (Iran) and evaluation of removal ability. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72: 1349–1353.

Connolly, E.L.; Guerinot, M.L. (2002) Iron stress in plants. *Genome Biology*, 3: 1024.1–1024.4.

Conte, S.S.; Walker, E.L. (2011) Transporters contributing to iron trafficking in plants. *Molecular Plant*, 4: 464-476

Demmig-Adams, B.; Adams, W.W. (2000) Harvesting sunlight safely. *Nature*, 403: 371-374.

Desimone, M.; Henke, A.; Wagner, E. (1996) Oxidative stress induces partial degradation of the large subunit of Ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase in isolated chloroplasts of barley. *Plant Physiology*, 111: 789-796.

Euclides R.F. (2004) *Sistema para análises estatísticas (SAEG 9.0)*. Viçosa: Funarbe.

Fan, H.B.; Wang, Y.H. (2000) Effects of simulated acid rain on germination, foliar damage, chlorophyll contents and seedling growth of five hardwood species growing in China Forest. *Ecology and Management*, 126: 321-329.

Genty, B.; Briantais, J.M.; Baker, N.R. (1989) The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta*, 990: 87-92.

Hänsch, R.; Mendel, R.R. (2009) Physiological functions of mineral micronutrients (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Mo, B, Cl). *Current Opinion in Plant Biology*, 12: 259–266.

Hoagland, D.R.; Arnon, D.I. (1950) *The waterculture method for growing plants without soil*. Berkeley: California Agricultural Experiment Station.

- Horton, P.; Ruban, A.V.; Walters, R.G. (1996) Regulation of light harvesting in green plants. *Annual Review Plant Physiology, Plant Molecular Biology*, 47: 655-684.
- Jeong, J., Guerinot, M.L. (2009) Homing in on iron homeostasis in plants. *Trends Plant Science*, 14: 280-285.
- Kampfenkel, K.; Montagu, M.V.; Inzé, D. (1995) Effects of Iron Excess on *Nicotiana plumbaginifolia*. *Plant Physiology*, 107: 725-735.
- Kramer, D.M.; Johnson, G.; Kiirats, O.; Edwards, G.E. (2004) New fluorescence parameters for the determination of QA redox state and excitation energy fluxes. *Photosynthesis Research*, 79: 209-218.
- Krause, G.H.; Weis, E. (1991) Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: The Basics. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 42: 313-349.
- Kuki, K.N.; Oliva, M.A.; Costa, A.C. (2009) The simulated effects of iron dust and acidity during the early stages of establishment of two coastal plant species. *Water, Air and Soil Pollution*, 196: 287-295.
- Marschner, H. (1995) Mineral nutrition of higher plant. 2.ed. NewYork: Academic Press. 889p.
- Maxwell, K.; Johnson, G.N. (2000) Chlorophyll fluorescence – a practical guide. *Journal of Experimental Botany*, 51: 659-668.
- McCann, J.H.; Solomon, K.R. (2000) The effect of creosote on membrane ion leakage in *Lyriophyllum spicatum* L. *Aquatic Toxicology*, 50: 275-284.
- Mishra, S.; Dubey, R.S. (2005) *Heavy metal toxicity induced alterations in photosynthetic metabolism in plants*. Cap. 45. In: Pessarakli. M. (ed) Handbook of Photosynthesis. 2 ed. 862 p.
- Mollard, F.P.O.; Insausti, P. (2011) Geographic variation in the flood-induced fluctuating temperature requirement for germination in *Setaria parviflora* seeds. *Plant Biology*, 13: 660-666.
- Monni, S.; Uhlig, C.; Hansen, E.; Magel, E. (2001) Ecophysiological responses of *Empetrum nigrum* to heavy metal pollution. *Environmental Pollution*, 112: 121-129.
- Müller, C. (2011) *Ação do excesso de ferro sobre os processos e componentes fotossintéticos e o mecanismo de dissipação de energia em arroz*. Tese de doutorado: Universidade Federal de Viçosa, 124p.
- Neves, N.R.; Oliva, M.A.; Centeno, D.C.; Costa, A.C.; Ribas, R.F.; Pereira, E.G. (2009) Photosynthesis and oxidative stress in the restinga plant species *Eugenia uniflora* L. exposed to simulated acid rain and iron ore dust deposition: Potential use in environmental risk assessment. *Science of the Total Environment*, 407: 3740-3745.

Nozoye, N.; Nagasaka, S.; Kobayashi, T.; Takahashi, M.; Sato, Y.; Sato, Y.; Uozumi, N.; Nakanishi, H.; Nishizawa, N.K. (2011) Phytosiderophore efflux transporters are crucial for iron acquisition in graminaceous plants. *The journal of biological chemistry*, 286: 5446–5454.

Oliveira, C.R.M.; Oliva, M.A.; Pereira, E.G. (2007) Efeito do material particulado de ferro no teor de pigmentos de *Schinus terebinthifolius* Raddi. *Revista Brasileira de Biociências*, 5: 681-683.

Ögren, E.; Öquist, G. (1985) Effects of drought on photosynthesis, chlorophyll fluorescence and photoinhibition susceptibility in intact willow leaves *Planta*, 166: 380.

Oxborough, K.; Baker, N.R. (1997) An instrument capable of imaging chlorophyll a fluorescence from intact leaves at very low irradiance and at cellular and subcellular levels. *Plant, Cell and Environment*, 20: 1473–1483.

Pereira, E.G. (2006) *Efeitos fisiológicos e bioquímicos causados pela deposição de ferro particulado em Clusia hilariana uma espécie de restinga*. Dissertação de mestrado: Universidade Federal de Viçosa. 64p.

Pereira, E.G.; Oliva, M.A.; Kuki, K.N.; Cambraia, J. (2009) Photosynthetic changes and oxidative stress caused by iron ore dust deposition in the tropical CAM tree *Clusia hilariana*. *Trees*, 23:277–285.

Ravet, K.; Touraine, B.; Boucherez, J.; Briat, J.; Gaymard, F.; Cellier, F. (2009) Ferritins control interaction between iron homeostasis and oxidative stress in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 57: 400–412.

Scheffer-Basso, S.M.; Rodrigues, G.L.; Bordignon, M.V. (2002) Caracterização Morfofisiológica e Anatômica de *Paspalum urvillei* (Steudel). *Revista Brasileira Zootecnia*, 31:1674-1679.

Schützendübel, A.; Polle, A. (2002) Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *Journal of Experimental Botany*, 53: 1351-1365.

Silva, M.M.P.; Vasquez, H.M.; Bressan-Smith, R.; Silva, J.F.C.; Erbesdobler, E.D.; Andrade Junior, P.S.C. (2006) Eficiência fotoquímica de gramíneas forrageiras tropicais submetidas à deficiência hídrica. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 35: 67-74.

Silva, L.C.; Azevedo, A.A. (2007) Anatomia de plantas de restinga e sua aplicação como ferramenta para a bioindicação. In: Luiz Fernando Tavares Menezes; Fábio Ribeiro Pires; Oberdan José Pereira. (Org.). *Ecossistemas Costeiros do Espírito Santo - Conservação e restauração*. Vitória: EDUFES, p. 213-233.

Sinha, S.; Gupta, M.; Chandra, P. (1997) Oxidative Stress Induced by Iron in *Hydrilla verticillata* (L.f.) Royle: Response of Antioxidants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 38: 286–291.

Suh, H.; Kim, C.S.; Lee, J.; Jung, J. (2002) Photodynamic effect of iron excess on photosystem II function in pea plants. *Photochemistry and Photobiology*, 75: 513-518.

Terry, N. (1980) Limiting factors in photosynthesis. I. Use of iron stress to control photochemical capacity *in vivo*. *Plant Physiology*, 65: 114-120.

Terry, N.; Abadía, J. (1986) Function of iron in chloroplasts. *Journal of Plant Nutrition* Volume, 9:609-646.

Tsai, T.; Huang, H. (2006) Effects of iron excess on cell viability and mitogen-activated protein kinase activation in rice roots. *Physiologiae Plantarum*, 127: 583–592.

Wellburn, A.R. (1994) The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of Plant Physiology*, 144: 307-313.

Tabela 1: Teor de clorofila *a*, *b* e carotenóides nas espécies *Setaria parviflora* e *Paspalum urvillei* nos diferentes tratamentos de Fe-EDTA.

Espécie	Fe-EDTA (mM)	Fe parte aérea (mg/Kg)	Pigmentos Fotossintéticos (µg.cm ⁻²)		
			Clor a	Clor b	Car
<i>Setaria parviflora</i>	0,019	76,50 ^{Ad}	17,62	1,60	0,07
	1	283,00 ^{Ac}	19,45	2,87	0,08
	2	382,50 ^{Abc}	19,58	2,07	0,08
	4	443,50 ^{Ab}	18,98	2,63	0,08
	7	620,75 ^{Ba}	15,52	2,16	0,06
<i>Paspalum urvillei</i>	0,019	71,25 ^{Ad}	10,42	0,83	0,04
	1	212,75 ^{Bc}	19,23	3,78	0,08
	2	257,00 ^{Bbc}	18,02	4,34	0,07
	4	371,50 ^{Bb}	17,82	3,48	0,07
	7	960,25 ^{Aa}	11,11	1,60	0,04
<i>Análise de variância</i>					
Fe-EDTA (Fe)		*	*	n.s.	*
Espécie (Esp)		n.s.	*	n.s.	*
Fe X Esp		*	n.s.	n.s.	n.s.
Bloco		n.s.	*	n.s.	*

Médias com teste de Tukey a 5% de probabilidade. (n.s. = não significativo).

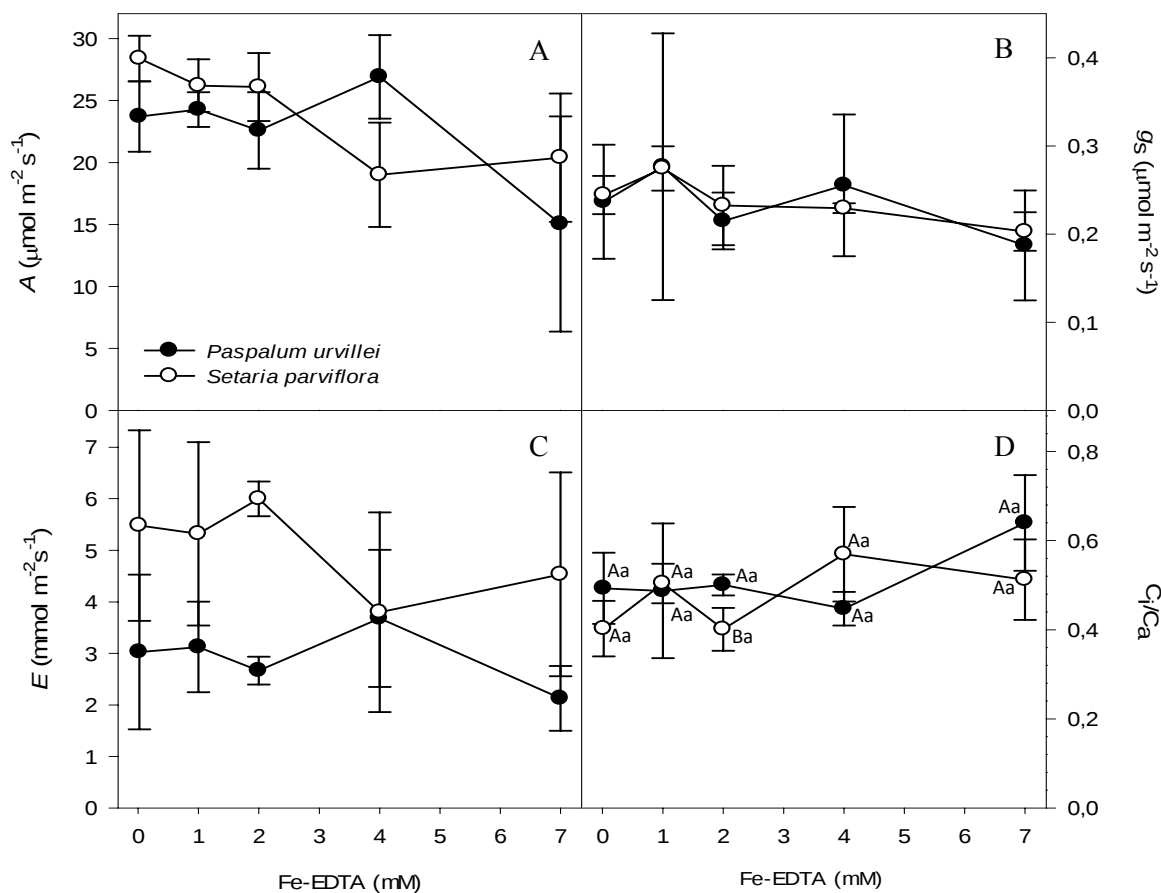


Figura 1: Taxa de assimilação líquida de CO_2 – A (A), condutância estomática - g_s (B), transpiração – E (C) e razão entre a concentração interna e externa de CO_2 – C_i/C_a (D) em folhas de *Setaria parviflora* (círculo aberto) e *Paspalum urvillei* (círculo fechado) nos diferentes tratamentos de Fe-EDTA. Barras verticais indicam o desvio padrão das médias dos tratamentos. Médias seguidas por letras iguais, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Letras maiúsculas comparam espécies e letras minúsculas comparam tratamento Fe-EDTA.

Tabela 2: Análise de variância dos dados representados na figura 1. Efeitos dos diferentes tratamentos de Fe-EDTA nas variáveis de trocas gasosas das espécies *Setaria parviflora* e *Paspalum urvillei*.

	A	g_s	E	C_i/C_a
Fe-EDTA (Fe)	*	n.s.	n.s.	*
Espécie (Esp)	n.s.	n.s.	*	n.s.
Fe X Esp	n.s.	n.s.	n.s.	*
Bloco	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Nível de significância: 5% de probabilidade. n.s. = não significativo.

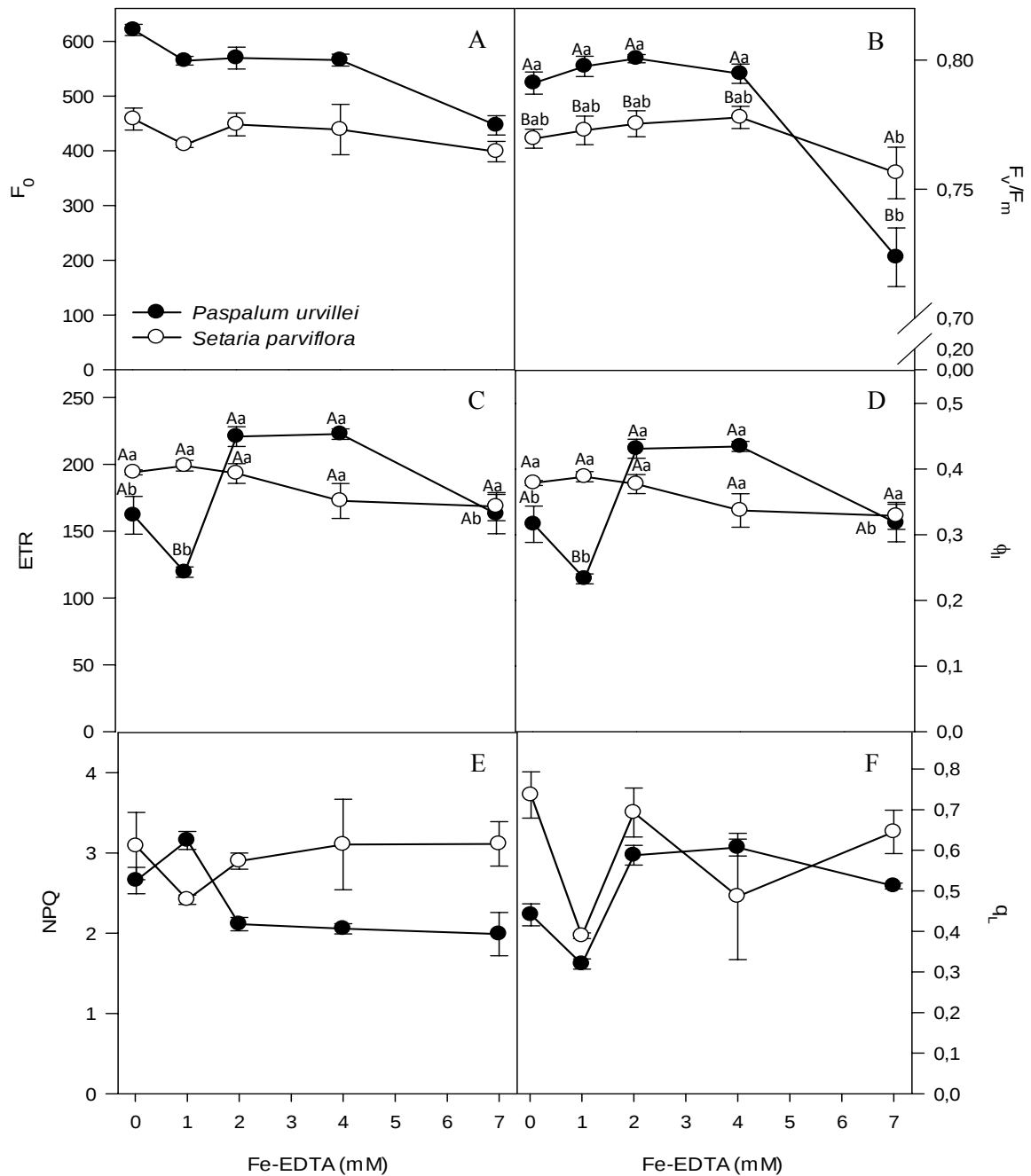


Figura 2: Fluorescência mínima – F_0 (A), eficiência quântica máxima do fotossistema II – F_v/F_m (B), taxa aparente de transporte de elétrons no PSII – ETR (C), rendimento quântico efetivo do PSII - ϕ_{II} (D), quenching não-fotoquímico – NPQ (E), quenching fotoquímico – q_L (F) em folhas de *Setaria parviflora* (circulo aberto) e *Paspalum urvillei* (circulo fechado) nos diferentes tratamentos de Fe-EDTA. Barras verticais indicam o desvio padrão das médias dos tratamentos. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Letras maiúsculas comparam espécies e letras minúsculas comparam os tratamentos Fe-EDTA.

Tabela 3: Análise de variância dos dados representados na figura 2. Efeitos dos diferentes tratamentos de Fe-EDTA nas variáveis de fluorescência da clorofila *a* das espécies *Setaria parviflora* e *Paspalum urvillei*.

Fe-EDTA (Fe)	*	*	*	*	n.s.	*
Espécie (Esp)	*	*	n.s.	n.s.	*	*
Fe X Esp	n.s.	*	*	*	n.s.	n.s.
Bloco	n.s.	*	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Nível de significância: 5% de probabilidade. n.s. = não significativo.

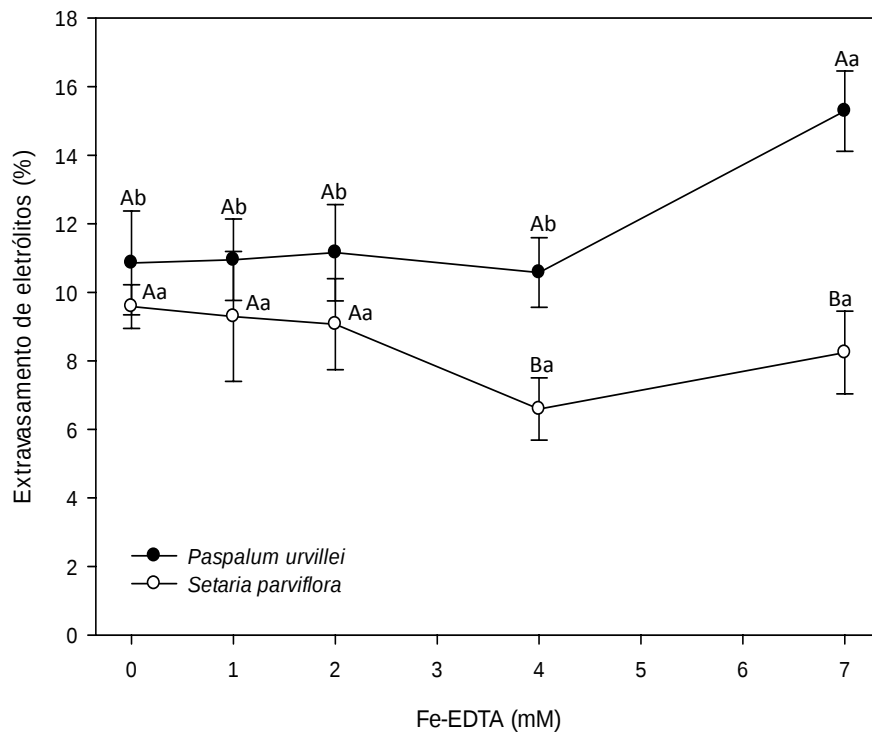


Figura 3: Extravasamento de eletrólitos em discos foliares de *Setaria parviflora* (circulo aberto) e *Paspalum urvillei* (circulo fechado) nos diferentes tratamentos de Fe-EDTA. Barras verticais indicam o desvio padrão das médias dos tratamentos. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Letras maiúsculas comparam espécies e letras minúsculas comparam os tratamentos Fe-EDTA.

4. CONCLUSÕES GERAIS

P. urvillei acumulou maior teor de ferro na parte aérea em relação a *S. parviflora*.

Nas espécies estudadas foram observados sintomas visuais típicos de toxidez pelo excesso de ferro. *P. urvillei* e *S. parviflora* apresentaram sintomas visuais e anatômicos menos severos em relação ao teor de ferro acumulado na matéria seca. As principais alterações anatômicas encontradas foram: nas folhas, alterações bruscas no formato das células da epiderme, do mesofilo e da bainha do feixe, retração do protoplasto e alteração no formato das células do metaxilema; nas raízes, retração do protoplasto, formação de tecido de cicatrização e colapso das células do córtex, alteração no formato das células da endoderme, do protoxilema, do metaxilema, do floema e colapso das células do cilindro vascular.

Os sintomas visuais e anatômicos encontrados nas espécies vegetais estudadas expostas ao excesso de ferro foram semelhantes. Entretanto, *P. urvillei* mostrou danos mais intensos do que *S. parviflora*.

P. urvillei apresentou menores valores de A , F_0 , da razão F_v/F_m e maior extravasamento de eletrólitos na concentração 7 mM de Fe-EDTA em comparação com *S. parviflora*. Além disso, *S. parviflora* apresentou maior eficiência na dissipação de energética do tipo não-fotoquímica (NPQ). Portanto, observa-se que *S. parviflora* apresentou estratégias mais eficientes do que *P. urvillei* na tolerância ao excesso de ferro.

Nesse trabalho, o estudo anatômico e fisiológico de *S. parviflora* e *P. urvillei* serviu como ferramenta para o entendimento dos mecanismos de toxicidade do ferro. Porém, para confirmar se essas espécies podem ser fitorremediadoras efetivas em ambientes contaminados pelo excesso de ferro são necessários estudos complementares principalmente, experimentos *in situ*.