

EDUARDO GUSMÃO PEREIRA

EFEITOS TÓXICOS DO FERRO: ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS E
MORFOLÓGICAS EM PLANTAS CULTIVADAS E DE RESTINGA

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2009

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

T

P436e
2009

Pereira, Eduardo Gusmão, 1977-

Efeitos tóxicos do ferro: alterações fisiológicas e morfológicas em plantas cultivadas e de restingas / Eduardo Gusmão Pereira. – Viçosa, MG, 2009.

177f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Marco Antônio Oliva Cano.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Plantas - Fisiologia. 2. *Oryza sativa*.
3. *Clusia spiritus-sanctensis*. 4. *Aspidosperma parvifolium*.
5. Fotossíntese. 6. Fluorescência. 7. Plantas - Efeito do ferro. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 571.2

EDUARDO GUSMÃO PEREIRA

EFEITOS TÓXICOS DO FERRO: ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS E
MORFOLÓGICAS EM PLANTAS CULTIVADAS E DE RESTINGA

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

Aprovada: 18 de dezembro de 2009

Andréa Miyasaka de Almeida
(Co-orientadora)

José Cambraia
(Co-orientador)

Luzimar Campos da Silva

Rogério Ferreira Ribas

Marco Antonio Oliva Cano
(Orientador)

Aos meus pais, dedico.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa, a todo o Departamento de Biologia Vegetal e ao programa de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq);

À SAMARCO MINERAÇÃO S.A. UBU – ES, principalmente ao Luíz;

À EPAMIG, principalmente ao Felipe Silva, Jardel e ao Plínio Soares;

Ao professor Marco Antonio Oliva;

À professora Andréa Miyasaka;

Ao professor José Cambraia;

À professora Luzimar Campos;

Ao grande amigo e professor Rogério Ribas;

À professora Marília Ventrella;

À professora Kacilda Naomi Kuki;

À professora Rosane Aguiar;

Ao Rogério Gomide;

Ao João Bosco de Freitas, José Antônio Bhering, Maria Mercês Gomes, Celso Costa, José do Carmo, Ângelo Lopes, Francine; Luciene Fernandes, José Cardoso e José Carlos;

Em especial à Laise Rosado e também ao Carlos Stopato, Pitt Wehr e Daniel Pinheiro;

A todos os amigos da Unidade de Crescimento de Plantas - UCP, especialmente Cláudio Meira, Caroline Müller, Advânio Silva, Claudinéia Santos, Alice Godoy, Thiago, Letícia dos Anjos, Letícia Nalon, Diego Carretero, Clenilso Mota, Maione Franco, Michelle, Patrícia Mendes, Adriana Magalhães;

Aos demais amigos que tive o prazer de desfrutar do agradável convívio nesses quatro anos, em especial Ricardo Montanari, Lílian Hasegawa, Ronnie Veloso, Ricardo Zanquetin, Leonardo Lucas, Élcio Meira, Gládis Jucosky, Werner Antunes, Danilo Daloso, Tales, Carla e Cléberon Ribeiro, Giselle Mendes, Denise Colares, Alan Costa, Michellia Pereira, Dayana Francino, Rosilene Mesquita;

A todos os colegas, funcionários e professores do Programa de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal - UFV;

Aos meus irmãos, Silvana, César, Neide e meus sobrinhos João Vitor e Mariana;

Aos meus pais, Levi Barbosa e Maria dos Reis;

À Elisa, pelo amor e companhia;

A Deus, pelo presente precioso: a vida.

BIOGRAFIA

Eduardo Gusmão Pereira, filho de Levi Barbosa Pereira e Maria dos Reis Gusmão V. Pereira, nasceu em Montes Claros – MG, no dia 15 de março de 1977. Concluiu o curso superior de Bacharelado em Ciências Biológicas em dezembro de 2003 pela Universidade Estadual de Montes Claros. Em fevereiro de 2006 recebeu o título de Mestre em Fisiologia Vegetal pela Universidade Federal de Viçosa. Em março de 2006 iniciou o curso de Doutorado na mesma universidade, no Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal do Departamento de Biologia Vegetal. Em novembro de 2009 assumiu o cargo de Professor de 3º Grau, Assistente I, da Universidade Federal de Viçosa, atuando no Campus de Florestal – MG.

ÍNDICE

	Página
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiv
1. INTRODUÇÃO GERAL	16
Referências	18
2. OBJETIVO GERAL	21
3. CAPÍTULO 1	22
Evaluation of iron toxicity in rice genotypes by non-invasive physiological tools [<i>Avaliação da toxidez por ferro em genótipos de arroz mediante metodologias fisiológicas não-invasivas</i>].....	22
Abstract	22
Resumo	23
Introduction	24
Material and methods	25
<i>Plant materials and experimental conditions</i>	25
<i>Morphological parameters and iron content into tissues</i>	26
<i>Chlorophyll content (SPAD index)</i>	26
<i>Gas exchange measurements</i>	26
<i>Chlorophyll fluorescence measurements</i>	27
<i>Assessing photorespiration in vivo</i>	29
Results	30
<i>Iron content, morphological and visual symptoms</i>	30
<i>Chlorophyll content index</i>	31
<i>Gas exchange parameters and photorespiration</i>	32
<i>Chlorophyll a fluorescence parameters</i>	35
Discussion	44
References	49
4. CAPÍTULO 2	53
Iron plaque formation and nutritional disorders in tropical rice genotypes from lowland and upland cropping systems [<i>Formação da placa de ferro e desordens nutricionais em genótipos tropicais de arroz oriundos de sistemas de cultivo de várzea e terras altas</i>].....	53
Abstract	53
Resumo	54
Introduction	55
Material and methods	56
<i>Plant materials and experimental conditions</i>	56
<i>Iron histochemistry and scanning electron microscopy</i>	57
<i>Plant growth, evaluation of root iron plaque formation and determination of minerals contents</i>	58
<i>Chlorophyll a fluorescence measurements</i>	58
Results	59
<i>Iron plaque formation, SEM and iron histochemistry</i>	59
<i>Dry weights and length of shoots and roots</i>	61

<i>Fe and others nutrients in iron plaque, uptake and translocation by rice</i>	65
<i>Chlorophyll a fluorescence</i>	70
Discussion	72
References	75
<u>5.</u> CAPÍTULO 3	79
Alterações fotossintéticas em resposta ao excesso de ferro e dióxido de enxofre em plantas de restinga [<i>Changes in photosynthesis due to iron excess and sulphur dioxide in restinga plant species</i>]	79
Resumo	79
Abstract	81
Introdução.....	82
Material e métodos	84
<i>Emissões de MSP_{Fe} e SO_2 em <i>C. spiritu-sanctensis</i> e <i>A. parvifolium</i> sob condições de campo</i>	84
<i>Deposição de material particulado de ferro e da neblina ácida simulada em <i>C. spiritu-sanctensis</i> e <i>A. parvifolium</i></i>	85
<i>Avaliação da deposição particulada de Fe e SO_2</i>	86
<i>Avaliação das trocas gasosas</i>	86
<i>Avaliação da fluorescência da clorofila a</i>	87
<i>Avaliação dos teores de pigmentos</i>	88
<i>Avaliação da permeabilidade de membranas</i>	88
<i>Determinação dos teores de malonaldeído (MDA)</i>	88
<i>Detecção histoquímica de ferro e microscopia eletrônica de varredura (MEV)</i>	89
<i>Determinação do teor de ferro, enxofre e nutrientes minerais</i>	89
Resultados	90
<i>Emissões de MSP_{Fe} e SO_2 em <i>C. spiritu-sanctensis</i> e <i>A. parvifolium</i> sob condições de campo</i>	90
<i>Deposição de material particulado de ferro e da neblina ácida simulada em <i>C. spiritu-sanctensis</i> e <i>A. parvifolium</i></i>	96
Discussão.....	107
Referências	111
6. CONCLUSÕES GERAIS	116

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

CAPÍTULO 1

Figure 1: Iron content in roots (inner panel) and shoots of four rice genotypes treated with Fe-EDTA in nutrient solution. Data are means±SE of four replicates.	31
Figure 2: Changes in chlorophyll content index (SPAD units) in leaves of four rice genotypes treated with Fe-EDTA in nutrient solution.	33
Figure 3: Changes in photosynthetic rate (A), stomatal conductance (g_s), transpiration (E) and C_i/C_a ratio in four rice genotypes treated with Fe-EDTA in nutrient solution.	34
Figure 4: Light response curve of net photosynthesis (A) of the rice genotypes BR IRGA 409 (circles) and BRA 041171 (inverted triangles) under control conditions (Fe-EDTA 0.019mM; open symbols) and under 7mM Fe-EDTA (closed symbols) in nutrient solution.	35
Figure 5: Chlorophyll a fluorescence images of minimal fluorescence (F_0), maximal PSII quantum yield (F_v/F_m), photochemical (q_L) and non-photochemical quenching (NPQ/4), quantum yield of photochemical energy conversion in PSII (ϕ_{II}), quantum yield of regulated (ϕ_{NPQ}) and non-regulated (ϕ_{NO}) energy dissipation in PSII of four <i>O. sativa</i> genotypes treated with Fe-EDTA (4 and 9 mM) in nutrient solution.	37
Figure 6: Minimal fluorescence (F_0), maximal PSII quantum yield (F_v/F_m), coefficient of photochemical quenching (q_L), non-photochemical quenching (NPQ) and apparent electron transport rate (ETR) in four rice genotypes treated with Fe-EDTA in nutrient solution.	38
Figure 7: Spatial variation in maximal PSII quantum yield (F_v/F_m) across a transect in the leaf blade in four rice genotypes under different Fe-EDTA doses in nutrient solution.	40
Figure 8: Relationship among quantum yield of photochemical energy conversion in PSII (ϕ_{II}), quantum yield of regulated (ϕ_{NPQ}) and non-regulated (ϕ_{NO}) energy dissipation in PSII of four rice genotypes treated with Fe-EDTA in nutrient solution.	42
Figure 9: Light response curve of fluorescence parameters of the rice genotypes BR IRGA 409 (circles) and BRA 041171 (inverted triangles) under control conditions (Fe-EDTA 0.019 mM; open symbols) and under 7 mM Fe-EDTA (closed symbols) in nutrient solution.	43
Table 1: Effects of iron treatments (Fe-EDTA) on dry weights of shoot and root, length of shoot and root and number of roots in rice plants.	32
Table 2: Effects of iron treatments (Fe-EDTA) on the total rate of electron transport through PSII (J_t ; $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), electron flow attributable to the carboxylation (J_c ; $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) and oxygenation (J_o ; $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) reactions of RuBP, ratio between these both factors (J_o/J_t), rate of CO ₂ production by photorespiration (R_1 ; $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) and the ratio between R_1 and net photosynthesis (R_1/A) in two genotypes of <i>O. sativa</i>	36
Table 3: Effects of iron treatments (Fe-EDTA) on chlorophyll a fluorescence parameters of four <i>O. sativa</i> genotypes: minimal fluorescence (F_0), maximal PSII quantum yield (F_v/F_m), photochemical (q_L) and non-photochemical quenching (NPQ), quantum yield of photochemical energy conversion in PSII (ϕ_{II}), quantum yield of regulated (ϕ_{NPQ}) and non-regulated (ϕ_{NO}) energy dissipation in PSII.	41

CAPÍTULO 2

Figure 1: Iron plaque experiment. A: Rice seeds germination procedure in the germination chamber; B: Seedlings transferred to plastic pots (3.8 L) containing nutrient solution; C and D: Disposition of the pots on the bench in the greenhouse; E: Control treatment without iron plaque; F: 4 mM FeSO ₄ treatment with iron plaque formation on root surface of the genotype Nipponbare.	60
Figure 2: Scanning electron micrographs of rice roots surface. Genotypes: BRS Atalanta (A and B), EPAGRI 107 (C and D), Canastra (E and F) e BRSMG Curinga (G e H). Control treatment (A, C, E and G) e FeSO ₄ treatment (B, D, F and H), after 168 h of exposure.	62
Figure 3: Iron histochemistry in rice roots transversal sections. Genotypes: BRS Atalanta (A and B), EPAGRI 107 (C and D), Canastra (E and F) and BRSMG Curinga (G and H). Control treatment (A, C, E and G).	63
Figure 4: Time effect on length (left panel) and dry weights (right panel) of shoots (circles) and roots (inverted triangles) in iron treated plants (4mM FeSO ₄ ; closed symbols) and control (open symbols) during 168 h.	64
Figure 5: Iron content in iron plaque on root surface of rice plants exposed to 4mM FeSO ₄ (closed symbols) and control treatment (open symbols) in nutrient solution during 168 h.	66
Figure 6: Correlation among iron and other nutrients content in root plaque (right panel) and in shoots (right panel) of five rice genotypes exposed to 4mM FeSO ₄ (closed symbols) or control treatment (open symbols) in nutrient solution.	69
Figure 7: Chlorophyll a fluorescence images (A) and graphic representations (B) of minimal fluorescence (F ₀), maximal PSII quantum yield (F _v /F _m), photochemical (q _p) and non-photochemical quenching (NPQ), and electron transport rate through PSII (ETR) of five rice genotypes exposed to 4 mM of FeSO ₄ (closed columns) or control treatment (open columns) in nutrient solution.	71
Table 1: Analysis of variance of data depicted in the figure 4.	66
Table 2: Mineral nutrient concentration (mg kg ⁻¹ _{rootDW}) in iron plaques of roots of five rice genotypes treated with 4 mM FeSO ₄ and control.	67
Table 3: Root iron content and shoot mineral nutrient concentration (mg kg ⁻¹ _{DW}) in five rice genotypes treated with 4 mM FeSO ₄ and control.	68
Table 4: Analysis of variance of data depicted in the figure 7. Effect of iron plaque formation on chlorophyll a fluorescence parameters.	70

CAPÍTULO 3

Figura 1: Deposição de material particulado (MP; A e B), teor de ferro (C e D) e enxofre (E e F) em plantas de <i>Clusia spiritu-sanctensis</i> (painéis da esquerda) e <i>Aspidosperma parvifolium</i> (painéis da direita) ao longo de um ano de exposição em área próxima a usina de beneficiamento de minério de ferro e em área referência.	91
Figura 2: Análise em Box-plot das variáveis de trocas gasosas em <i>Clusia spiritu-sanctensis</i> (painéis da esquerda) e <i>Aspidosperma parvifolium</i> (painéis da direita) em área próxima a usina de beneficiamento de minério de ferro e em área referência.	92
Figura 3: Alterações na eficiência quântica máxima do PSII (F _v /F _m), rendimento quântico efetivo do PSII (φ _{II}), rendimentos quânticos de dissipação não-fotoquímica regulada (φ _{NPQ}) e não-regulada (φ _{NO}) em <i>Clusia spiritu-sanctensis</i> (painéis da	

esquerda) e <i>Aspidosperma parvifolium</i> (painéis da direita) ao longo de um ano de exposição aos poluentes em área próxima a usina de beneficiamento de minério de ferro e em área referência.....	94
Figura 4: Alterações nos teores de clorofila <i>a</i> (Chl <i>a</i>), clorofila <i>b</i> (Chl <i>b</i>) e carotenóides (Car) em <i>Clusia spiritu-sanctensis</i> (painéis da esquerda) e <i>Aspidosperma parvifolium</i> (painéis da direita) ao longo de um ano de exposição em área próxima a usina de beneficiamento de minério de ferro e em área referência. ...	95
Figura 5: Alterações no extravasamento de eletrólitos (EL) em <i>Clusia spiritu-sanctensis</i> (painéis da esquerda) e <i>Aspidosperma parvifolium</i> (painéis da direita) ao longo de um ano de exposição em área próxima a usina de beneficiamento de minério de ferro e em área referência.....	96
Figura 6: Superfície foliar adaxial (A, D, F e H) e abaxial (B, C, E, G, I e J) de <i>Clusia spiritu-sanctensis</i> após 100 dias de aplicação de neblina ácida simulada e MSP _{Fe} . Tratamento controle (A - C); com aplicação de MSP _{Fe} ao solo (D e E); com aplicação de neblina ácida simulada pH 3,0 (F e G) e com combinação entre neblina ácida simulada e MSP _{Fe} no solo (H - J).....	97
Figura 7: Superfície foliar adaxial (A, D, F, G e I) e abaxial (B, C, E, H, J e K) de <i>Aspidosperma parvifolium</i> após 30 dias com aplicação de neblina ácida simulada e MSP _{Fe} . Tratamento controle (A - C), com deposição de MSP _{Fe} no solo (D e E), com aplicação de neblina ácida simulada pH 3,0 (F - H) e a combinação entre neblina ácida simulada e MSP _{Fe} no solo (I - K).....	98
Figura 8: Detecção histoquímica de ferro em cortes transversais da lâmina foliar de <i>Clusia spiritu-sanctensis</i> após 100 dias com aplicação de neblina ácida simulada e MSP _{Fe} . Tratamento controle (B), com deposição de MSP _{Fe} no solo (C e D), com aplicação de neblina ácida simulada pH 3,0 (E e F) e a combinação entre neblina ácida simulada e MSP _{Fe} no solo (G e H).....	100
Figura 9: Detecção histoquímica de ferro em cortes transversais da lâmina foliar de <i>Aspidosperma parvifolium</i> após 30 dias com aplicação de neblina ácida simulada e MSP _{Fe} . Tratamento controle (B), com deposição de MSP _{Fe} no solo (C e D), com aplicação de neblina ácida simulada pH 3,0 (E e F) e a combinação entre neblina ácida simulada e MSP _{Fe} no solo (G e H).....	102
Figura 10: Alterações na taxa fotossintética (<i>A</i> ; A e B), condutância estomática (<i>g_s</i> ; C e D); razão entre a concentração interna e externa de CO ₂ (<i>C_i/C_a</i> ; E e F) em <i>Clusia spiritu-sanctensis</i> (painéis da esquerda) e <i>Aspidosperma parvifolium</i> (painéis da direita) em resposta a aplicação de neblina ácida simulada e MSP _{Fe}	103
Figura 11: Imagens dos parâmetros de fluorescência da clorofila (A) e representações gráficas (B) da eficiência quântica máxima do PSII (<i>F_v/F_m</i>), fluorescência mínima (<i>F₀</i>), <i>quenching</i> fotoquímico (<i>q_p</i>) e não-fotoquímico (NPQ) e taxa aparente de transporte de elétrons no PSII (ETR) em <i>Clusia spiritu-sanctensis</i> (painéis da esquerda) e <i>Aspidosperma parvifolium</i> (painéis da direita) em resposta a aplicação de neblina ácida simulada e MSP _{Fe}	106
Figura 12: Alterações no rendimento quântico efetivo do PSII (<i>φ_{II}</i> ; A e B) e nos rendimentos quânticos de dissipação não-fotoquímica regulada (<i>φ_{NPQ}</i> ; C e D) e não-regulada (<i>φ_{NO}</i> ; E e F) em <i>Clusia spiritu-sanctensis</i> (painéis da esquerda) e <i>Aspidosperma parvifolium</i> (painéis da direita) em resposta a aplicação de neblina ácida simulada e MSP _{Fe}	107
Tabela 1: Teor foliar de ferro e outros nutrientes minerais (mg kg ⁻¹ _{MS}) em <i>Clusia spiritu-sanctensis</i> e <i>Aspidosperma parvifolium</i> em resposta à aplicação de neblina ácida simulada e MSP _{Fe}	104

Tabela 2: Teor de malonaldeído (MDA; $\text{nmol g}^{-1}_{\text{MF}}$) e extravasamento de eletrólitos (EL; %) em <i>Clusia spiritu-sanctensis</i> e <i>Aspidosperma parvifolium</i> em resposta a aplicação de neblina ácida simulada e MSP_{Fe}	106
--	-----

RESUMO

PEREIRA, Eduardo Gusmão; D.S., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2009.

Efeitos tóxicos do ferro: alterações fisiológicas e morfológicas em plantas cultivadas e de restinga. Orientador: Marco Antonio Oliva Cano. Co-orientadores: Andréa Miyasaka de Almeida, José Cambraia.

O ferro (Fe) é um micronutriente essencial envolvido em vários processos do metabolismo vegetal como fotossíntese, respiração, fixação de nitrogênio, entre outros. Entretanto, em altas concentrações torna-se tóxico. O aumento exagerado da disponibilidade de Fe para as plantas pode ser observado naturalmente em solos ácidos constantemente alagados ou em eventos antrópicos como a mineração e beneficiamento de minério de ferro. A toxidez por ferro é o principal fator abiótico que limita a produtividade de arroz em cultivo alagado. Por outro lado, o crescente número de usinas do setor de mineração e beneficiamento de Fe pode constituir um risco ambiental para espécies vegetais em fragmentos de restinga próximos a fontes poluidoras, lançando nessas áreas considerável quantidade de Fe na forma de material sólido particulado de Fe (MSP_{Fe}) juntamente com precipitações ácidas caracterizadas por alta concentração de SO_2 . Desta forma, o objetivo do presente estudo foi caracterizar fisiologicamente o processo de toxidez por ferro em plantas, abrangendo causas antrópicas, como em regiões sujeitas à poluição por MSP_{Fe} e SO_2 , e causas naturais, como no caso dos solos ácidos inundados onde o arroz é cultivado. Em condições de cultivo hidropônico, os efeitos do Fe-EDTA em genótipos de arroz foram examinados utilizando parâmetros fisiológicos não invasivos. O aumento no teor foliar de Fe levou a alterações nos diversos parâmetros avaliados, podendo ser empregados na prévia detecção dos efeitos tóxicos do ferro, antes do aparecimento de sintomas visuais. A redução na taxa fotossintética nos genótipos de arroz pode ser atribuída a componentes estomáticos e a componentes não-estomáticos em resposta ao aparecimento de estresse oxidativo. Reduções nos teores de clorofila e distúrbios nos processos de captura e utilização da energia luminosa foram constantemente verificados nos genótipos mais sensíveis. Os efeitos prejudiciais do ferro em excesso também ocorreram com a formação de uma placa de ferro na superfície radicular, alterando processos nutricionais em plantas. Tais efeitos foram investigados em genótipos tropicais de arroz provenientes de cultivo alagado e de terras altas. A aplicação de $FeSO_4$ na solução nutritiva levou ao

aparecimento da placa de ferro, com coloração alaranjada, em todos os genótipos estudados, porém em maior intensidade nos genótipos de várzea. Observou-se redução significativa no teor de P, Mg e Mn na parte aérea em decorrência da formação da placa de ferro nas raízes. Frequentemente foram observadas rupturas das células epidérmicas da raiz. Quanto aos aspectos da toxidez por ferro e outros elementos imposta por fontes de mineração, observou-se que a deposição de MSP_{Fe} e SO_2 causou reduções em diversos parâmetros fotossintéticos em duas espécies de restinga: *Clusia spiritusanctensis* e *Aspidosperma parvifolium*, sob condições de campo e em casa de vegetação. As plantas expostas aos poluentes apresentaram acúmulo significativo de ferro nos tecidos. Os maiores teores desse elemento foram observados em *A. parvifolium* que também apresentou incremento nos teores de enxofre sob condições de campo, sendo observados sintomas mais severos nessa espécie. Desta forma, pode-se concluir que a toxidez por Fe pode limitar o desempenho fotossintético e nutricional de genótipos de arroz sensíveis ao excesso de Fe e que as emissões de MSP_{Fe} e outros poluentes por fontes mineradoras podem causar desequilíbrio na dinâmica sucessional da restinga e comprometer o desenvolvimento das espécies vegetais.

ABSTRACT

PEREIRA, Eduardo Gusmão; D.S., Universidade Federal de Viçosa, december, 2009.

Iron toxic effects: physiological and morphological changes in cultivated and restinga plants. Adviser: Marco Antonio Oliva Cano. Co-advisers: Andréa Miyasaka de Almeida, José Cambraia.

Iron (Fe) is an essential micronutrient for several processes in plant metabolism, such as photosynthesis, respiration, nitrogen fixation and others. However, reaching high levels it became toxic. The exaggerated increase in Fe availability to plants can be found naturally in waterlogged acidic soils or due anthropic consequences, such as iron ore processing and beneficiation factories. In lowland rice, Fe is the major abiotic factor limiting plant productivity. In other hand, the increasing number of iron ore factories near the restinga, may constitute an environmental hazard. These factories release considerable amounts of sulfur dioxide (SO₂) and iron ore dust into the air over the restinga as iron solid particulate matter (SPM_{Fe}) and acid precipitation. Thus, the purpose of this study was characterize with physiological evaluations the different processes of iron toxicity in plants, covering anthropic causes, such as SPM_{Fe} and SO₂ pollution, and natural causes, such as iron toxicity in waterlogged soils. Using hydroponic culture the effects of Fe-EDTA on rice genotypes were evaluated by non-invasive methodologies. The rise in shoot iron content led to changes in most of non-invasive physiological parameters used. These parameters may be used in early detection of iron toxicity prior to visual symptoms. Reduction in rice genotypes photosynthesis can be attributed to stomatal and non-stomatal limitations in response to the oxidative stress. Chlorophyll content reduction and impairment in light capture and utilization were commonly observed in sensitive genotypes. The damaging effects of iron also occurred with iron plaque formation on the root surface, changing nutritional processes. Those effects were investigated in tropical rice genotypes from lowland and upland cropping systems. FeSO₄ application in nutrient solution caused iron plaque formation, with reddish precipitated with higher intensity in lowland genotypes. Iron plaque caused significant reductions in the shoot content of P, Mn and Mg. Frequently was observed ruptures of the root epidermis. To iron toxicity related to mining sources, it was observed reductions in several photosynthetic parameters caused by SPM_{Fe} and

SO₂ deposition on two restinga plant species: *Clusia spiritu-sanctensis* and *Aspidosperma parvifolium*, under field and greenhouse conditions. The plant exposure to the pollutants leads to significant increase of Fe into tissues. The higher Fe content was found in *A. parvifolium* which one also presented increased sulphur content under field exposure. The most severe symptoms were observed in this species. In conclusion, the iron toxicity may limit the nutritional and photosynthetic performances of sensitive rice genotypes. The SPM_{Fe} and other pollutants emissions from iron ore factories may lead to imbalance in successional dynamic in restinga and affect the development of the plant species in this ecosystem.

1. INTRODUÇÃO GERAL

O ferro (Fe) é o mineral mais abundante na crosta terrestre. Como nutriente essencial para as plantas, está envolvido em processos fundamentais como fotossíntese, respiração, metabolismo de nitrogênio, síntese de DNA e de hormônios (Briat e Lobréaux, 1997; Becana *et al.*, 1998). O Fe presente no solo está em sua maior parte na forma oxidada (Fe^{3+}), que não é prontamente absorvido pelas plantas (Fageria *et al.*, 1990).

De modo geral, a absorção de ferro pelas plantas ocorre através de duas estratégias distintas. A primeira (estratégia I), comum entre dicotiledôneas e monocotiledôneas não-gramíneas, envolve a acidificação do solo pela extrusão de prótons e absorção de Fe^{2+} . Outra estratégia (estratégia II), utilizada pelas gramíneas, consiste na produção e liberação de fitossideróforos que complexam o Fe na rizosfera, sendo o complexo Fe^{3+} -fitossideróforo absorvido pelas raízes (Hell e Stephan, 2003). Com exceção das gramíneas, que apresentam a estratégia II, diversas plantas, algas, leveduras e bactérias absorvem o ferro por meio da estratégia de solubilização do Fe^{3+} à Fe^{2+} (Guerinot, 1994). O arroz (*Oryza sativa* L.) apresenta ambas as estratégias de absorção de Fe (Ishimaru *et al.*, 2006).

Em condições nutricionais normais, o teor de Fe nas plantas varia de 0,05 a 0,25 $\text{mg g}^{-1}_{\text{MS}}$ (Marschner, 1995). Para manutenção do crescimento ótimo, monocotiledôneas requerem maiores concentrações de Fe na solução de cultivo do que espécies dicotiledôneas (Christ, 1974). Quando em excesso, a toxidez por ferro pode ocorrer por meio da absorção e acúmulo excessivo ou por meio da sua precipitação sobre as raízes, formando uma crosta de óxido férrico que altera a absorção de outros nutrientes como o fósforo, potássio e zinco (Howeler, 1973).

Em situações de acúmulo excessivo de ferro nos tecidos, ocorre a potencialização de estresse oxidativo, com aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). Em nível celular o Fe^{2+} pode reagir com o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) através da reação de Fenton, gerando radicais hidroxilas (OH^\cdot ; Guerinot e Yi, 1994; Becana *et al.*, 1998). O Fe^{2+} pode ainda reagir com o oxigênio e formar radical superóxido (O_2^\cdot ; Marschner *et al.*, 1995).

O OH^{\bullet} é considerado a espécie reativa de oxigênio mais tóxica para a célula; juntamente com outras ROS leva a danos irreversíveis na estrutura das membranas celulares, modificando suas atividades enzimáticas e resultando na perda da permeabilidade seletiva, com consequente vazamento de eletrólitos, ocasionando o colapso celular e deterioração do tecido (Becana *et al.*, 1998; Fang *et al.*, 2001; Pereira *et al.*, 2009).

A formação da placa de ferro devido à precipitação do metal na superfície radicular é comumente encontrada em ambientes alagados com alto teor desse metal. Para a formação da placa ocorre oxidação do íon ferroso a íon férrico, seguido da precipitação de óxido ou hidróxido de ferro, em função da capacidade oxidativa das raízes (Chen *et al.*, 1980; Taylor *et al.*, 1984). Além do ferro, outros elementos podem ocorrer em placas de ferro formadas naturalmente, como o P, K, Zn, As, Cd, Cu, S, entre outros (Howeler, 1973, Greipsson e Crowder, 1992). A placa de ferro é composta predominantemente de hidróxido férrico, goetita e siderita (Hansel *et al.*, 2001).

A elevação da concentração de ferro a níveis tóxicos para as plantas pode ser observado naturalmente em solos ácidos constantemente inundados (Dobermann e Fairhurst, 2000) ou em eventos antrópicos como a mineração e beneficiamento de minério de ferro (Kuki *et al.*, 2008a).

A toxidez por ferro em excesso é um dos principais fatores abióticos que limitam a produtividade do arroz alagado (Dobermann e Fairhurst, 2000). Durante o alagamento do solo, o oxigênio molecular é consumido pelos microrganismos aeróbicos, que com o tempo são substituídos pelos anaeróbicos, resultando, num primeiro momento, em um ambiente de redução e acúmulo de CO_2 (Ponnamperuma, 1972). Adicionalmente, a redução de compostos oxidados aumenta a disponibilidade de ferro (Becana *et al.*, 1998). Portanto, em solos ácidos, a anoxia e redução do pH, decorrentes do alagamento, podem levar à redução e solubilização de grandes quantidades de ferro (Ponnamperuma, 1972). O aumento na concentração de ferro pode chegar a níveis tóxicos para as plantas cultivadas neste ambiente (Silva e Ranno, 2005). A toxicidade desse elemento provoca manchas necróticas nas folhas, escurecimento das raízes e inibição do crescimento da planta (Dobermann e Fairhurst, 2000).

Outro aspecto importante da toxidez por ferro em plantas é observado em regiões de vegetação nativa ao entorno de usinas de mineração e beneficiamento

do metal. O crescente número destas usinas no litoral brasileiro é responsável pela emissão de diversos poluentes atmosféricos que podem comprometer a sobrevivência de espécies sensíveis encontradas na vegetação de restinga (Silva *et al.*, 2005, 2006; Kuki *et al.*, 2008a b; Pereira *et al.*, 2009). Dentre esses poluentes encontra-se o material sólido particulado de ferro (MSP_{Fe}). Além dos efeitos tóxicos específicos do ferro sobre as plantas, o MSP_{Fe} pode causar danos à vegetação por efeitos físicos: bloqueio da radiação luminosa, abrasamento, aquecimento foliar, alterações em processos como fotossíntese e transpiração (Pereira *et al.*, 2009); ou por efeitos químicos: alterações no pH, no estado nutricional e lixiviação de nutrientes das folhas (Grantz *et al.*, 2003).

Dessa forma, as plantas podem estar expostas a níveis tóxicos de ferro sob diversas circunstâncias, sejam naturais ou provocadas de maneira antrópica. A capacidade de uma espécie vegetal sobreviver e tolerar os efeitos do ferro em excesso dependerá de diversas características como o genótipo, estágio de crescimento, disponibilidade de recursos e microhabitat (Levin, 1998; Grantz *et al.*, 2003). Todas essas características possuem estreita relação com aspectos fisiológicos dos vegetais. Entretanto, tratando-se de um mesmo fator (excesso de ferro) as plantas podem apresentar respostas fisiológicas distintas, dependendo da forma específica de estresse.

Referências

- Becana M, Moran JF, 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.
- Briat JF, Lobréaux S.** 1997. Iron transport and storage in plants. *Trends in Plant Science* **2**, 187–193.
- Chen CC; Dixon JB, Turner FT.** 1980. Iron coatings on roots: mineralogy and quantity influencing factors. *Soil Science Society of America*, **44**, 635–639.
- Christ RA.** 1974. Iron requirement and iron uptake from various iron compounds by different plant species. *Plant Physiology* **54**, 582–585.
- Dobermann A, Fairhurst T.** 2000. *Rice: Nutrient Disorders & Nutrient Management*. Potash and Phosphate Institute, Potash and Phosphate Institute of Canada, and International Rice Research Institute, Singapore. 191pp.

- Fageria NK, Baligar VC, Wright RJ.** 1990. Iron nutrition of plants: an overview on the chemistry and physiology of its deficiency and toxicity. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* **25**, 553–570.
- Fang WC, Wang JW, Lin CC, Kao CH.** 2001. Iron induction of lipid peroxidation and effects on antioxidative enzyme activities in rice leaves. *Plant Growth Regulation* **35**, 75–80.
- Grantz DA, Garnerb JHB, Johnson DW.** 2003. Ecological effects of particulate matter. *Environment International* **29**, 213–239.
- Greipsson S, Crowder AA** 1992. Amelioration of copper and nickel toxicity by iron plaque on roots of rice (*Oryza sativa*). *Canadian Journal of Botany*, **70**, 824–830.
- Guerinot ML.** 1994. Microbial iron transport. *Annual Review of Microbiology* **48**, 743–772.
- Guerinot ML, Yi Y.** 1994. Iron: Nutritious, noxious, and not readily available. *Plant Physiology* **104**, 815–820.
- Hansel CM, Fendorf S, Sutton S, Newville M.** 2001. Characterization of Fe plaque and associated metals on the roots of mine-waste impact aquatic plants. *Environmental Science and Technology*, **35**, 3863–3868.
- Hell R, Stephan UW.** 2003. Iron uptake, trafficking and homeostasis in plants. *Planta* **216**, 541–551.
- Howeler RH.** 1973. Iron- induced orange disease of rice in relation to physico-chemical changes in flooded oxisol. *Soil Science Society of American Proceedment*, **37**, 898–903.
- Ishimaru Y, Suzuki M, Tsukamoto T, Suzuki K, Nakazono M, Kobayashi T, Wada Y, Watanabe S, Matsuhashi S, Takahash M, Nakanishi H, Mori S, Nishizawa NK.** 2006. Rice plants take up iron as an Fe³⁺-phytosiderophore and as Fe²⁺. *The Plant Journal*, **45**, 335–346.
- Kuki KN, Oliva MA, Pereira EG.** 2008a. Iron Ore Industry Emissions as a Potential Ecological Risk Factor for Tropical Coastal Vegetation. *Environmental Management* **42**, 111–121.
- Kuki KN, Oliva MA, Pereira EG, Costa AC, 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.
- Levin AS.** 1998. Ecosystems and the biosphere as complex adaptive systems. *Ecosystems* **1**, 431–436.
- Marschner H.** 1995. **Mineral nutrition of higher plants.** Academic Press, London. Second ed. 889p
- Pereira EG, Oliva MA, Kuki KN, 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.
- Ponnamperuma FN.** 1972. The chemical of submerged soils. *Advances in Agronomy* **24**, 29–96.

Silva LC, Oliva MA, Azevedo AA, Araújo JM, Aguiar RM. 2005. Micromorphological and anatomical alterations caused by simulated acid rain in Restinga plants: *Eugenia uniflora* and *Clusia hilariana*. *Water, Air, and Soil Pollution* **168**, 129–143.

Silva LC, Oliva MA, Azevedo AA, Araújo JM. 2006. Responses of restinga plant species to pollution from an iron pelletization factory. *Water Air Soil Pollut* **17**, 241–56.

Silva LS, Ranno SK. 2005. Calagem em solos de várzea e a disponibilidade de nutrientes na solução do solo após o alagamento. *Ciência Rural, Santa Maria* **35**, 1054–1061.

Taylor GJ, Crowder AA, Rodden R. 1984. Formation and morphology of an iron plaque on the roots of *Typha latifolia* L. grown in solution culture. *American Journal of Botany*, **71**, 666–675.

2. OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos da toxidez por excesso de ferro sobre aspectos fisiológicos e morfológicos em plantas de restinga, sujeitas à poluição por MSP_{Fe} e SO_2 , e em plantas cultivadas, como no caso do arroz cultivado em solos ácidos inundados.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Utilizar técnicas fisiológicas não invasivas na caracterização da toxidez por excesso de ferro em diferentes genótipos de arroz e em espécies vegetais de restinga;
- Avaliar os efeitos do excesso de ferro em solução nutritiva sobre fotossíntese, fotorrespiração e teor de pigmentos em genótipos de arroz irrigado;
- Avaliar as diferenças na formação e concentração de ferro e outros nutrientes minerais na placa de ferro, entre genótipos de arroz dos sistemas de cultivo de várzea e terras altas;
- Avaliar os efeitos da formação da placa de ferro sobre aspectos nutricionais dos diferentes genótipos de arroz cultivados em sistema hidropônico;
- Avaliar os efeitos da formação da placa de ferro sobre processos fotossintéticos e sobre aspectos da anatomia radicular e crescimento dos genótipos de arroz de várzea e terras altas;
- Avaliar a resposta fisiológica de *Clusia spiritus-sanctensis* e *Aspidosperma parvifolium* às emissões de MSP_{Fe} e SO_2 por usinas de beneficiamento de minério de ferro em condições de campo;
- Investigar os efeitos das deposições de MSP_{Fe} e SO_2 , próximo a fragmentos de restinga, sobre fotossíntese, fluorescência da clorofila *a*, teor de pigmentos fotossintéticos, permeabilidade relativa de membranas em *C. spiritus-sanctensis* e *A. parvifolium* em condições de campo.
- Avaliar os efeitos isolados e combinados da aplicação de MSP_{Fe} no solo e de neblina ácida simulada, sobre aspectos fisiológicos, nutricionais e anatômicos em *C. spiritus-sanctensis* e *A. parvifolium*.

CAPÍTULO 1

Evaluation of iron toxicity in rice genotypes by non-invasive physiological tools

Abstract Iron toxicity is the most important stress to rice in many lowland environments worldwide. Rice genotypes differ widely in iron excess tolerance. A physiological evaluation of iron toxicity in rice was performed using non-invasive photosynthesis, photorespiration and chlorophyll *a* fluorescence imaging measurements and also chlorophyll content by SPAD. Four rice genotypes (BR IRGA 409; BR IRGA 412; BRA 041171 and BRA 041152) from Brazilian breeding programs were used. Fe²⁺ was supplied in nutrient solution as Fe-EDTA (0.019; 4; 7; 9 mM). Increases in shoot iron content due to Fe²⁺ treatments led to changes in most of non-invasive physiological parameters used. The reduction in rice photosynthesis can be attributed to stomatal limitations at moderate Fe²⁺ doses (4 mM), and both stomatal and non-stomatal limitations at higher doses. Non-stomatal limitation of photosynthesis may be related to oxidative damage to the chloroplast. Decreased chlorophyll content and limited photochemical ability to cope with light excess was characteristic of the more sensitive and iron accumulators genotypes (BRA 041171 and BRA 041152). Chlorophyll fluorescence imaging revealed spatial heterogeneity of photosynthesis under excessive iron. The results showed the usefulness of non-invasive physiological measurements to assess differences between genotypes and contributed to understanding the rice photosynthetic response to toxic levels of iron in nutrient solution.

Key words: Chlorophyll *a* fluorescence imaging, *Oryza sativa*, photorespiration, photosynthesis, quantum yields.

Avaliação da toxidez por ferro em genótipos de arroz mediante metodologias fisiológicas não-invasivas

Resumo A toxidez por ferro em arroz é o mais importante estresse em ambientes de cultivo alagado em todo o mundo. Existe grande diferença quanto à tolerância ao ferro entre os genótipos de arroz. Avaliações da toxidez por ferro em arroz foram realizadas empregando metodologias fisiológicas não-invasivas como fotossíntese, fotorrespiração, fluorescência da clorofila *a* e também o teor de clorofila com o uso do SPAD. Quatro genótipos de arroz (BR IRGA 409; BR IRGA 412; BRA 041171 e BRA 041152) oriundos de programas brasileiros de melhoramento foram utilizados. O Fe²⁺ foi aplicado em solução nutritiva como Fe-EDTA (0,019; 4; 7; 9 mM). O aumento no teor foliar de ferro devido aos tratamentos com Fe²⁺ resultaram em alterações na maioria dos parâmetros fisiológicos não-invasivos utilizados. A diminuição na taxa fotossintética é atribuída a limitações estomáticas sob doses moderadas de Fe²⁺ (4 mM), e devido a limitações estomáticas e não estomáticas em altas doses de ferro. A limitação não-estomática da fotossíntese pode ser relacionada com os danos oxidativos ao cloroplasto. Diminuição nos teores de clorofila e capacidade fotoquímica limitada sob luz em excesso foram características comuns encontradas nos genótipos sensíveis e com maior acúmulo de ferro (BRA 041171 and BRA 041152). Imagens de fluorescência da clorofila *a* revelaram heterogeneidade espacial no processo fotossintético em condições de excesso de ferro. Os resultados comprovam a eficácia no uso de medições fisiológicas não-invasivas na detecção das diferenças entre os genótipos e na contribuição do entendimento das respostas fotossintéticas de arroz aos níveis tóxicos de ferro em solução nutritiva.

Palavras-chave: Imagem de fluorescência da clorofila *a*, *Oryza sativa*, fotorrespiração, fotossíntese, rendimento quântico.

Introduction

Iron is an essential element in photosynthetic tissues as a constituent of the complexes involved in electron transport (Guerinot and Yi, 1994), but in excess it is toxic, unleashing reactive oxygen species overproduction, especially hydroxyl radical (OH^\cdot) via Fenton reaction, which impairs cellular structure irreversibly and damages membranes, DNA and proteins (Becana *et al.*, 1998).

Iron toxicity is the most widespread nutritional disorder affecting wetland-rice production (Dobermann and Fairhurst, 2000). Iron in aerobic soils is found as insoluble Fe^{3+} but a large part of this element could be reduced to the more soluble Fe^{2+} in waterlogged soils characterized by anaerobic conditions and low pH, as found in some systems of rice culture. The excessive Fe^{2+} absorption by rice plants leads to the appearance of typical leaf iron toxicity symptoms called “bronzing”, brown spots starting from the leaf tips and spreading toward the leaf base. The roots of rice plants affected by iron toxicity become scanty, coarse, short and blunted, and dark brown in color. Also commonly reported are stunted root and shoot growth, limited yield (Becker and Asch, 2005; Dorlodot *et al.*, 2005) and nutritional disorders (Ottow *et al.*, 1983; Genon *et al.*, 1994).

Rice genotypes differ widely in iron excess tolerance (Fageria and Rabelo, 1987), which makes it possible to screen genotypes with enhanced iron tolerance. However, so far commonly employed destructive methods such as shoot and root dry weight, iron and other nutrients content in tissue or simple visual bronzing effect evaluations (Sahrawat *et al.*, 1996; Luo *et al.*, 1997; Asch *et al.*, 2005). Moreover, little is known about the specific iron excess effects on rice photosynthesis *in vivo*. Photosynthetic parameters can be useful in future selection of rice genotypes and varieties with higher productivity in environments where biomass production is the major limiting factor for yield (Hubbart *et al.*, 2007). These parameters can give a good, quantitative, rapid, non-invasive and non-destructive measurement of changes in plant metabolism prior to visual effects detection.

Chlorophyll (Chl) *a* fluorometry has long been recognized as a valuable non-invasive technique for probing photosynthesis (Bolh ar-Nordenkampf *et al.*, 1989). More recently, Chl *a* fluorescence imaging systems have been employed to investigate the functioning of photosystem II (PSII) on a spatial level over the leaf

surface (Oxborough, 2004). These methods coupled with also non-invasive chlorophyll measurements and gas exchange, may be used to be used to assess photochemical process impairments under various environmental conditions and applied in breeding programs.

In the present study, rice genotypes were cultivated under iron excess and the iron toxicity effects were evaluated by non-invasive tools. The main objective was to use these techniques to elucidate iron toxicity effects on photosynthetic processes in rice.

Material and methods

Plant materials and experimental conditions

Four rice (*Oryza sativa* L.) genotypes from Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA Clima Temperado: BR IRGA 409 and BR IRGA 412) and from Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG: BRA 041171 and BRA 041152) were used. Seeds sterilized with 10% sodium hypochlorite for 10 min were thoroughly washed in deionized water. They were germinated over nylon gauze adapted to 3.8 L plastic pots filled with deionized water under a 12h photoperiod ($200\text{--}250\ \mu\text{mol m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$) temperature of 28 °C and relative humidity of 100% for 72h in germination chamber. Each plastic pot contained 15 seedlings as the experimental unity. The seedlings were then transferred to greenhouse conditions (average temperature of 24.4 °C) and grown hydroponically in non-aerated Hoagland nutrition solution at full strength (Hoagland and Arnon, 1938). The nutrient solution was renewed weekly and the pH daily adjusted to 4.0. When the seedlings reached 30 days old (V6 growth stage; Counce *et al.*, 2000) the Fe^{2+} treatments were applied. Iron was supplied as Fe-EDTA ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ plus EDTA) at the concentration of 0.019 (control) 4, 7 or 9 mM. Seven days after exposure to the treatments the analysis were carried out. The experiment followed a randomized block factorial (4×4) design with four genotypes and four Fe-EDTA concentrations, with four replicates per treatment. The data were subjected to analysis of variance (ANOVA) and the means compared by Tukey's test at 5% of probability using the software SAEG 9.1 - UFV.

Morphological parameters and iron content into tissues

For the measurement of growth parameters and iron content, five seedlings from each replication of control and treatments were randomly selected. The seedlings were separated into shoots and roots. The number of roots and the root and shoot length were evaluated. Roots were washed in deionized water, rinsed for 5 min in 1 mM of EDTA-Na solution and then washed again in deionized water in order to remove iron from the free spaces, and gently dried in a paper towel. The plant material was dried at 75 °C until constant weight and determined the root and shoot dry weight.

The total iron content in roots and shoots was determined by atomic absorption spectrophotometry (GBC Avanta — GBC Scientific Equipment Ltd, Australia), after wet-digestion with nitric–perchloric acid solution (3:1) at 200 °C (Kampfenkel *et al.*, 1995).

Chlorophyll content (SPAD index)

Leaf relative greenness was measured by the non-destructive chlorophyll meter SPAD-502 (Minolta, Japan). Each leaf was characterized by the mean of four measurements. All non-invasive sampling took place on a point of the leaf that was a distance from the tip equivalent to one third of the length of the entire leaf.

Gas exchange measurements

Gas exchange measurements were made on attached fully expanded leaves using a portable photosynthesis system (LI-6400; Li-Cor Inc., Lincoln, Nebraska, USA). Light ($1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) was provided by a light-emitting diode (LED; model 6400-02B Red-Blue, LiCor Inc.). The measured leaves were labeled, and leaf areas were calculated based on the labeled area. In a second experiment, with the genotypes BR IRGA 409 and BRA 041171, was used the “light curve” routine of the software OPEN 3.4, in seven levels of photosynthetic photon flux density (PPFD, 0, 50, 100, 200, 500, 800 and $1000 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) in a decreasing order. The minimum time allowed for reading stabilization at each level of PPFD was 120 s, and the maximum time for saving each reading was 160

s. It was set a flow rate of $500 \mu\text{mol s}^{-1}$ and a maximum coefficient of variation (C.V.) of 1%. The measurements were performed from 8:30 to 11:30 a.m. at the greenhouse conditions, with relative humidity of 40–70%, temperature of 24–30 °C and atmospheric CO_2 concentration ranging from 370 to $400 \mu\text{mol mol}^{-1}$. The CO_2 concentration and water vapour between the leaf and the reference chamber were automatically matched before data were recorded.

Chlorophyll fluorescence measurements

Leaf chlorophyll fluorescence was measured immediately after leaf gas exchange measurements at the same leaf using a pulse amplitude modulated chlorophyll fluorometer (Mini-PAM; Heinz Walz, Effeltrich, GmbH). Previously, at the predawn, dark-adapted parameters were taken. Minimal fluorescence (F_0) was measured under a weak modulating light ($0.15 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), and maximal fluorescence (F_m) was induced by a saturating pulse of light ($6000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) applied over 0.8 s. The maximal photosystem II (PSII) quantum yield was determined as F_v/F_m (Kitajima and Butler, 1975), where F_v is the difference between F_m and F_0 . An actinic light source (peak wavelength 650 nm) in the same irradiance used for gas exchange measurements ($1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) was applied for 35 s to achieve steady-state photosynthesis and to obtain F_s (steady-state fluorescence yield), after which a second saturation pulse was applied for 0.8 s to obtain F_m' (light-adapted maximal fluorescence). The measurements of F_0 were performed with the measuring beam set to a frequency of 600 Hz, whereas all measurements of F_m and F_m' were performed with the measuring beam automatically switching to 20 kHz during the saturating flash. The minimal fluorescence in a light-acclimated state (F_0') was calculated using the approximation of Oxborough and Baker (1997): $F_0' = F_0 / (F_m - F_0 / F_m + F_0 / F_m')$.

The same leaves were again dark adapted for 30 min prior to measure chlorophyll fluorescence using the Imaging-PAM fluorometer (Heinz Walz, Effeltrich, GmbH) in order to investigate the spatial heterogeneity of Chl fluorescence parameters. The same array of blue light-emitting diodes (a total of 96 LEDs; 470 nm) was applied by this measuring system for fluorescence excitation, actinic illumination and saturating light pulses. The charge-coupled device (CCD) camera has a resolution of 640×480 pixels. For maximal spatial

resolution, were chosen an imaged area of 20×30 mm in the same region used to the others non-destructive analysis. Pixel value images of the fluorescence parameters were displayed with help of a colour code ranging from black (0.000) to pink (1.000). The same chlorophyll fluorescence yields described above were obtained. Measuring light pulses were applied at low frequency (1 Hz) to assess F_0 (at $0.5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). During actinic illumination ($204 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) and saturation pulses ($2400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), the frequency of the measuring light pulses was automatically increased to 8 Hz. Saturation pulses were applied at 20 s intervals for 100 s in order to determine F_m' and steady-state F_s . The chlorophyll fluorescence parameters of the last interval were used. The leaf surface was divided in three areas of interest: center, right and left side.

For assessment of photosynthesis in response of increasing in light intensity, pre-programmed light curves were recorded in a second series of experiments with the genotypes BR IRGA 409 and BRA 041171. After dark adaptation (30 min) and measurement of F_0 and F_m , the leaf was exposed to increasing light intensity (wavelength of 470 nm) varying from 5 to $965 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ in nine steps of 40 s. At the end of each light intensity, a saturation pulse was applied for measurements of F and F_m' , from which automatically images of the fluorescence parameters were generated by the ImagingWin software.

The same fluorescence parameters were calculated for both measurement systems. The coefficient of photochemical quenching (q_L) is a measurement of the fraction of open PSII reaction centers. Differently of q_P (photochemical quenching based on a pure puddle antenna model), q_L is based on the lake model of PSII antenna pigment organization (Lavergne and Trissl, 1995), and it was defined by Kramer *et al.* (2004) as $q_L = (F_m' - F_s)/(F_m' - F_0') \times F_0'/F_s = q_P \times F_0'/F_s$. The non-photochemical quenching of fluorescence (NPQ) was used to estimate the rate constant for thermal energy dissipation; $\text{NPQ} = F_m - F_m'/F_m'$ (Bilger and Björkman, 1990).

Besides the F_v/F_m , the quantum yield of photochemical energy conversion in PSII was calculated as $\phi_{II} = F_m' - F_s/F_m'$ (Genty *et al.*, 1989). The quantum yield of non-regulated energy dissipated in PSII (ϕ_{NO}) was calculated according to Kramer *et al.* (2004) by the equation: $\phi_{NO} = 1/(\text{NPQ} + 1 + q_L \times (F_m/F_0 - 1))$. At the same way, the quantum yield of regulated energy dissipation in PSII (ϕ_{NPQ}), can be calculated as: $\phi_{NPQ} = 1 - (F_m' - F_s/F_m') - 1/(\text{NPQ} + 1 + q_L \times (F_m/F_0 - 1)) = 1 -$

$\phi_{II} - \phi_{NO}$ (Kramer *et al.*, 2004). Surprisingly, these expressions based on lake model derived by Kramer and co-workers can be achieved by more simple expressions ($\phi_{NO} = F_s/F_m$; $\phi_{NPQ} = F_s/F_m' - F_s/F_m$) first presented by Genty *et al.* (1996). Both derivations of expressions (by Genty *et al.*, 1996) or by Kramer *et al.*, 2004) arrive exactly at the same numerical result when F_0' obtained by the approximation of Oxborough and Baker (1997) is used. Thus, these expressions are not only valid for a lake model, but also for a puddle model (Klughammer and Schreiber, 2008).

The apparent electron transport rate (ETR) was calculated as $ETR = 0.5 \times I_A \times \phi_{II} \times PAR$. Where 0.5 is the assumed proportion of absorbed quanta used by PSII reaction centres (Melis *et al.*, 1987) and I_A is the absorbed irradiance. Only for Mini-PAM measurements were assumed an average leaf absorptance of 0.84.

Assessing photorespiration in vivo

When photosynthesis was steady under light intensity of $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, the electron transport rate driving photosynthesis and photorespiration was independently measured by fluorescence (Mini-PAM; Heinz Walz, Effeltrich, GmbH) and gas exchange (LI-6400; Li-Cor Inc., Lincoln, Nebraska, USA) in the same condition described previously. From these measurements, was possible the estimation of photorespiration rate *in vivo* (Di Marco *et al.* 1994; Valentini *et al.* 1995) in the second series of experiments with the genotypes BR IRGA 409 and BRA 041171. We followed the approach of Valentini *et al.* (1995), which assumes that the linear electron flow is driven to carboxylation and oxygenation of ribulose-1,5-bisphosphate (i. e. all the other processes consuming light-driven electrons are negligible), four electrons are required for each carboxylation or oxygenation cycle and one CO_2 is released every two oxygenation cycles by glycine decarboxylation in the photorespiratory pathway. Thus,

$$J_t = \Phi_e \cdot PAR,$$

$$J_o = 2/3[J_t - 4(A + R_d)],$$

$$J_c = 4(A + R_d + R_l),$$

where J_t is the total rate of electron transport through photosystem II to photosynthesis and photorespiration; J_c and J_o are the electron costs attributable to the carboxylation and oxygenase reactions of RuBP, respectively, Φ_e is the

quantum efficiency of linear electron flow through PSII, A is the net CO_2 assimilation rate, R_d is the dark respiration rate and R_1 is the rate of CO_2 production by photorespiration. R_1 can then be calculated as (Valentini *et al.* 1995):

$$R_1 = [J_t - 4(A + R_d)]/12.$$

Results

Iron content, morphological and visual symptoms

All the genotypes showed significant increases in iron content in shoots and roots (Fig. 1). In control treatment shoot iron content was similar among genotypes; however, with different responses from 4mM dose. Shoot iron content of the genotype BRA 041171 increased 23.3 times in the 9 mM Fe-EDTA treatment compared to control. In general, the increase in shoot iron content followed the ascending order: BR IRGA 409; BR IRGA 412; BRA 041152 and BRA 041171. No significant differences were found in the root iron content of the genotypes (Fig. 1). In plants exposed to higher iron doses in nutrient solution brown spots were detected in the leaves, starting from leaf tips. In the higher iron accumulating genotypes (BRA 041152 and BRA 041171) this bronzing symptom spreaded toward the leaf base, while leaf tips had dry and burnt aspect. After the first days of exposure to iron, roots of treated plants became light-brown, suggesting the formation of iron plaque around the root surface. However at the end of experimental period in the highest Fe-EDTA doses (9 mM) a black stain was formed on the root surface.

Independent of Fe treatments, the genotypes showed differences in morphological parameters (Tab. 1). The genotype BRA 041152 and BRA 041171 showed the lowest number of roots and the lowest values of dry weight and length of shoots and roots in all Fe-EDTA concentrations. The Fe treatments caused significant reductions only in the number of roots, while the others parameters remained unchanged (Tab. 1).

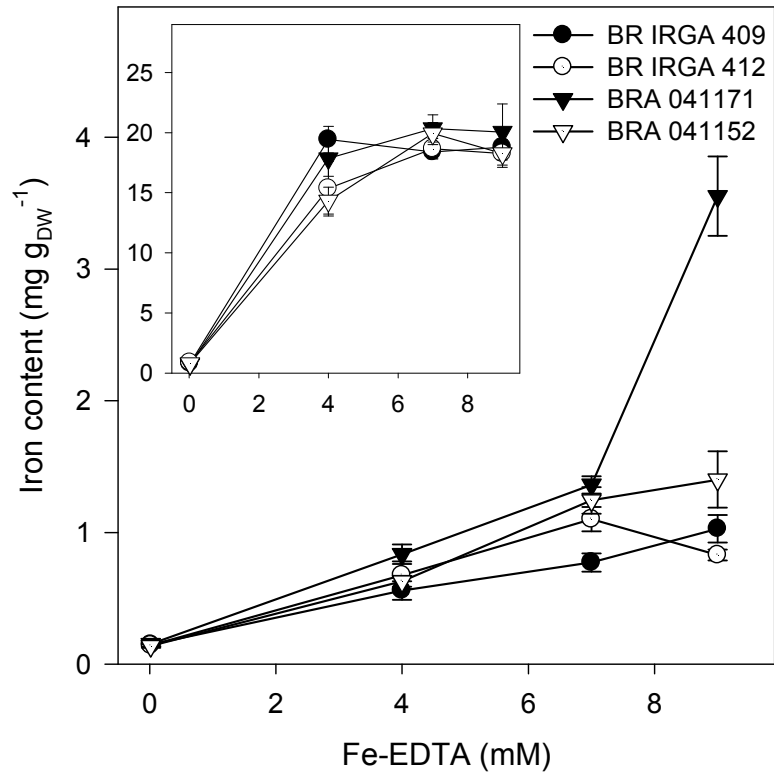


Figure 1: Iron content in roots (inner panel) and shoots of four rice genotypes treated with Fe-EDTA in nutrient solution. Data are means \pm SE of four replicates.

Chlorophyll content index

Excluding the genotype BR IRGA 412, which did not show significant reduction in chlorophyll content, the increase in Fe-EDTA concentration over 7 mM resulted in lower chlorophyll content (Fig. 2). That genotype and BR IRGA 409 showed the highest chlorophyll content and lower sensitivity to the iron treatments. These genotypes also reached the highest chlorophyll content when exposed to 7 mM Fe-EDTA treatment, where the differences between genotypes were greatest.

Table 1: Effects of iron treatments (Fe-EDTA) on dry weights of shoot and root, length of shoot and root and number of roots in rice plants.

	Fe-EDTA (mM)	BR IRGA 409	BR IRGA 412	BRA 041171	BRA 041152	Mean
Shoot dry weight (g plant ⁻¹)	0.019	0.395±0.06	0.411±0.08	0.453±0.12	0.193±0.07	0.363a
	4	0.607±0.08	0.600±0.08	0.280±0.05	0.212±0.03	0.425a
	7	0.460±0.05	0.384±0.1	0.392±0.13	0.177±0.03	0.353a
	9	0.343±0.08	0.348±0.03	0.360±0.06	0.197±0.02	0.312a
	Mean	0.451a	0.436a	0.371a	0.195b	
Root dry weight (g plant ⁻¹)	0.019	0.082±0.01	0.075±0.01	0.093±0.03	0.049±0.02	0.075a
	4	0.081±0.01	0.089±0.01	0.037±0.00	0.037±0.01	0.061a
	7	0.077±0.01	0.067±0.02	0.057±0.02	0.030±0.01	0.058a
	9	0.063±0.02	0.059±0.00	0.054±0.01	0.037±0.01	0.053a
	Mean	0.076a	0.072a	0.060ab	0.038b	
Shoot length (Cm ⁻¹)	0.019	60.4±4.3	61.0±3.2	53.7±0.7	44.2±3.4	54.8a
	4	64.0±3.1	60.4±2.1	43.7±2.3	48.4±2.4	54.2a
	7	61.8±2.1	52.3±6.2	50.9±4.6	45.7±3.5	52.7a
	9	53.6±4.0	55.3±2.3	45.9±3.4	47.8±2.0	50.7a
	Mean	60.0a	57.2a	48.6b	46.5b	
Root length (Cm ⁻¹)	0.019	30.7±2.5	26.8±1.2	27.1±2.7	24.0±1.6	27.2a
	4	32.0±1.2	31.7±0.8	19.3±1.9	25.0±2.3	27.0a
	7	32.7±1.0	31.4±2.9	25.2±2.1	26.6±2.4	28.9a
	9	30.1±1.5	30.6±1.3	22.4±0.5	29.1±0.7	28.1a
	Mean	31.4a	30.1a	23.5b	26.2b	
Number of roots	0.019	31.9±2.0	30.6±3.7	32.6±4.1	22.9±2.8	29.5a
	4	27.6±2.8	27.2±2.5	18.4±1.7	19.2±1.2	23.1b
	7	23.3±1.6	19.4±1.9	22.8±5.2	15.4±1.4	20.2b
	9	21.5±3.0	20.3±1.9	23.4±2.1	18.4±1.2	20.9b
	Mean	26.1a	24.3a	24.3a	19.0b	

The means of genotypes (columns) and Fe-EDTA doses (rows) are shown due to not significant interactions between genotypes and Fe-EDTA doses. Means followed by different letters are significant by Tukey's test at 0.05 probability level. Means±SE, n=4.

Gas exchange parameters and photorespiration

The increase in Fe-EDTA doses in nutrient solution caused significant changes in all gas exchange evaluated parameters (Fig. 3). However, the genotypes differed only on net photosynthesis (*A*) and Ci/Ca ratio. Higher net photosynthesis and transpiration values found in BR IRGA 409 and BR IRGA

412 genotypes coincided with lower values of Ci/Ca ratio in these genotypes. Exposure of plants to 4 mM Fe-EDTA decreased the Ci/Ca ratio in response to the stomatal resistance; however, higher iron doses in nutrient solution brought increases in this ratio, even under continuous reductions in g_s (Fig. 3). The photosynthetic CO₂ assimilation rate increased with increasing PPFD (Fig. 4), irrespective of iron treatments or genotypes. Under non-stressed conditions the genotypes BR IRGA 409 and BRA 041171 showed similar responses, with light saturation above 1000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and lower light compensation point. However, under iron excess was observed a marked change in the slope of the light curve for photosynthesis near the compensation point, outstanding in genotype BRA 041171 (Fig. 4). This genotype also showed the lowest photosynthetic rate under high irradiances.

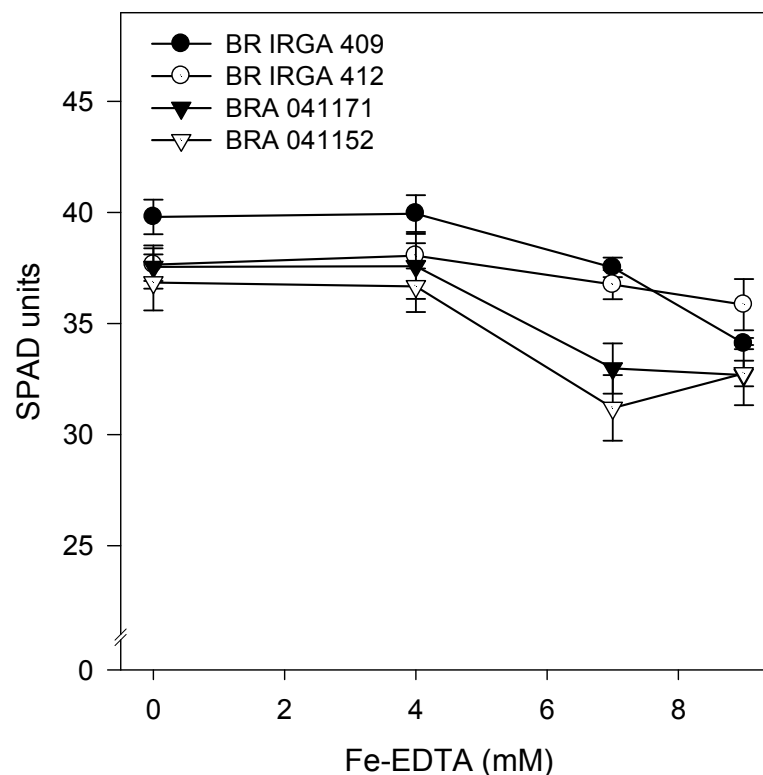


Figure 2: Changes in chlorophyll content index (SPAD units) in leaves of four rice genotypes treated with Fe-EDTA in nutrient solution. Data are means \pm SE of four replicates.

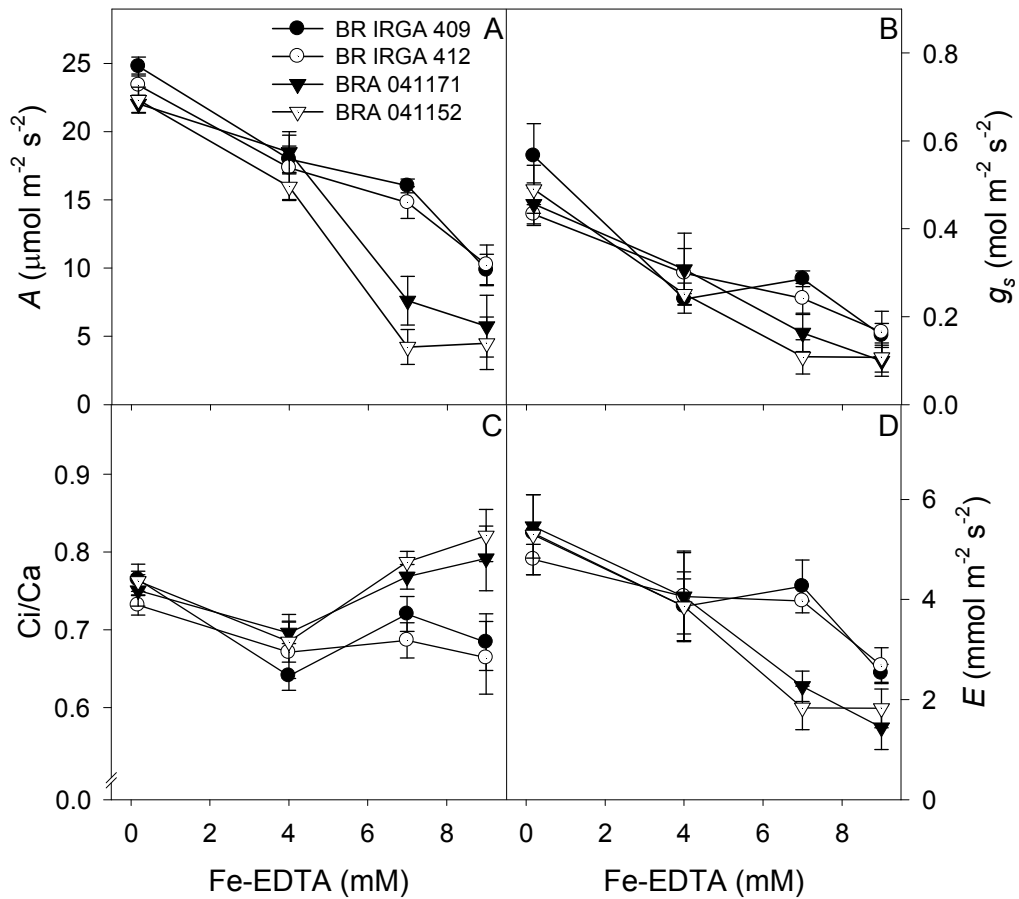


Figure 3: Changes in photosynthetic rate (A), stomatal conductance (g_s), transpiration (E) and C_i/C_a ratio in four rice genotypes treated with Fe-EDTA in nutrient solution. Data are means \pm SE of four replicates.

The total electron flow (J_t) did not change with the Fe-EDTA treatment in both genotypes (Tab. 2). However, the electron flow drive to carboxylative capacity (J_c) was reduced mainly in the most sensitive genotype (BRA 041171). This reduction was compensate with increasing in oxygenative electron flow (J_o), resulting in increased photorespiratory rate (R_i) of stressed plants (Tab. 2)

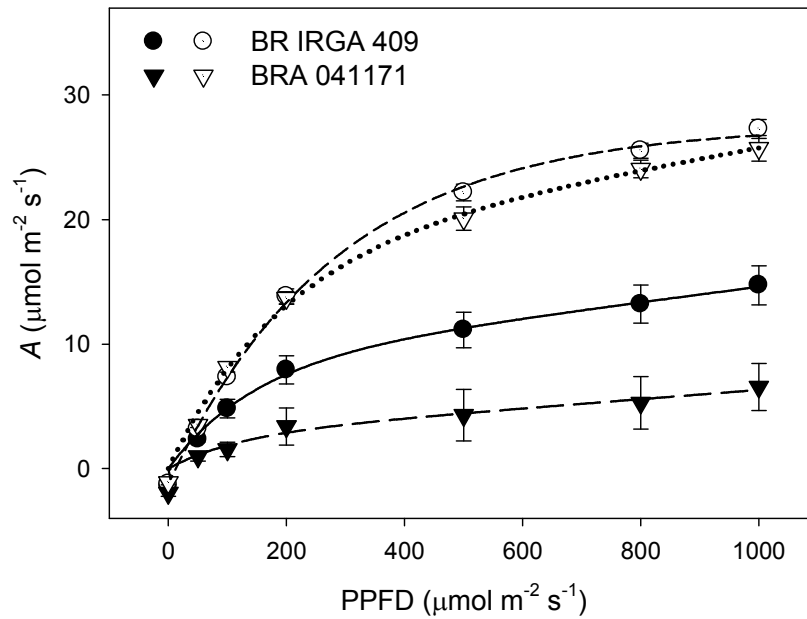


Figure 4: Light response curve of net photosynthesis (A) of the rice genotypes BR IRGA 409 (circles) and BRA 041171 (inverted triangles) under control conditions (Fe-EDTA 0.019mM; open symbols) and under 7mM Fe-EDTA (closed symbols) in nutrient solution. Data are means \pm SE of four replicates. The data were fitted against exponential regression (Iqbal *et al.*, 1997; $p < 0.001$).

Chlorophyll a fluorescence parameters

The plants exposure to iron excess caused increases in basal fluorescence (F_0) and reduction in maximal photosystem II (PSII) quantum yield (F_v/F_m) of dark-adapted samples (Fig. 5 and 6). The genotype BR IRGA 412 showed less change in these parameters. At higher iron doses there were significant differences in F_v/F_m values over the leaf surface of the genotypes BRA 041171 and BRA 041152 (Fig. 6), the iron toxicity effects were more severe on the extremities of the leaf (Fig. 7).

Fe-EDTA treatments did not induce significant changes in photochemical quenching coefficient based on a lake model (q_L) neither in apparent electron transport rate through PSII (ETR) of genotypes BR IRGA 409 and BR IRGA 412. However, there was significant decrease in q_L and ETR of genotypes BRA 041171 and BRA 041152 when exposed to the 7mM dose in high PPFD (Tab. 3).

Table 2: Effects of iron treatments (Fe-EDTA) on the total rate of electron transport through PSII (J_t ; $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), electron flow attributable to the carboxylation (J_c ; $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) and oxygenation (J_o ; $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) reactions of RuBP, ratio between these both factors (J_o/J_t), rate of CO₂ production by photorespiration (R_1 ; $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) and the ratio between R_1 and net photosynthesis (R_1/A) in two genotypes of *O. sativa*.

Genotype	Fe-EDTA	J_t	J_c	J_o	J_o/J_t	R_1	R_1/A
BR IRGA 409	0.019 mM	145.1±11.7	113.9±5.3 ^{Aa}	31.1±8.9	0.79±0.04	3.89±1.11	0.17±0.06 ^{Aa}
	7 mM	147.2±6.5	77.3±0.8 ^{Aa}	69.9±6.4	0.53±0.02	8.74±0.80	1.01±0.16 ^{Ba}
BRA 041171	0.019 mM	137.8±3.6	105.7±0.5 ^{Ab}	32.1±3.7	0.77±0.02	4.02±0.46	0.19±0.03 ^{Ab}
	7 mM	128.0±9.3	55.3±4.4 ^{Bb}	72.7±5.8	0.43±0.02	9.09±0.73	3.80±0.74 ^{Aa}
<i>Analysis of variance</i>							
	Fe-EDTA (Fe)	n.s.	***	***	***	*	***
	Genotype (G)	n.s.	**	n.s.	n.s.	n.s.	**
	Fe × G	n.s.	*	n.s.	n.s.	n.s.	**
	Block	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

To J_c and R_1/A means followed by the same letters are not significantly different by Tukey's test at 5% of probability. Capital letters compare genotypes and small letters compare Fe-EDTA treatments. Data are means±SE, n=4. Significant level: p<0.05 (*); p<0.01(**); p<0.001(***); n.s. (not significant).

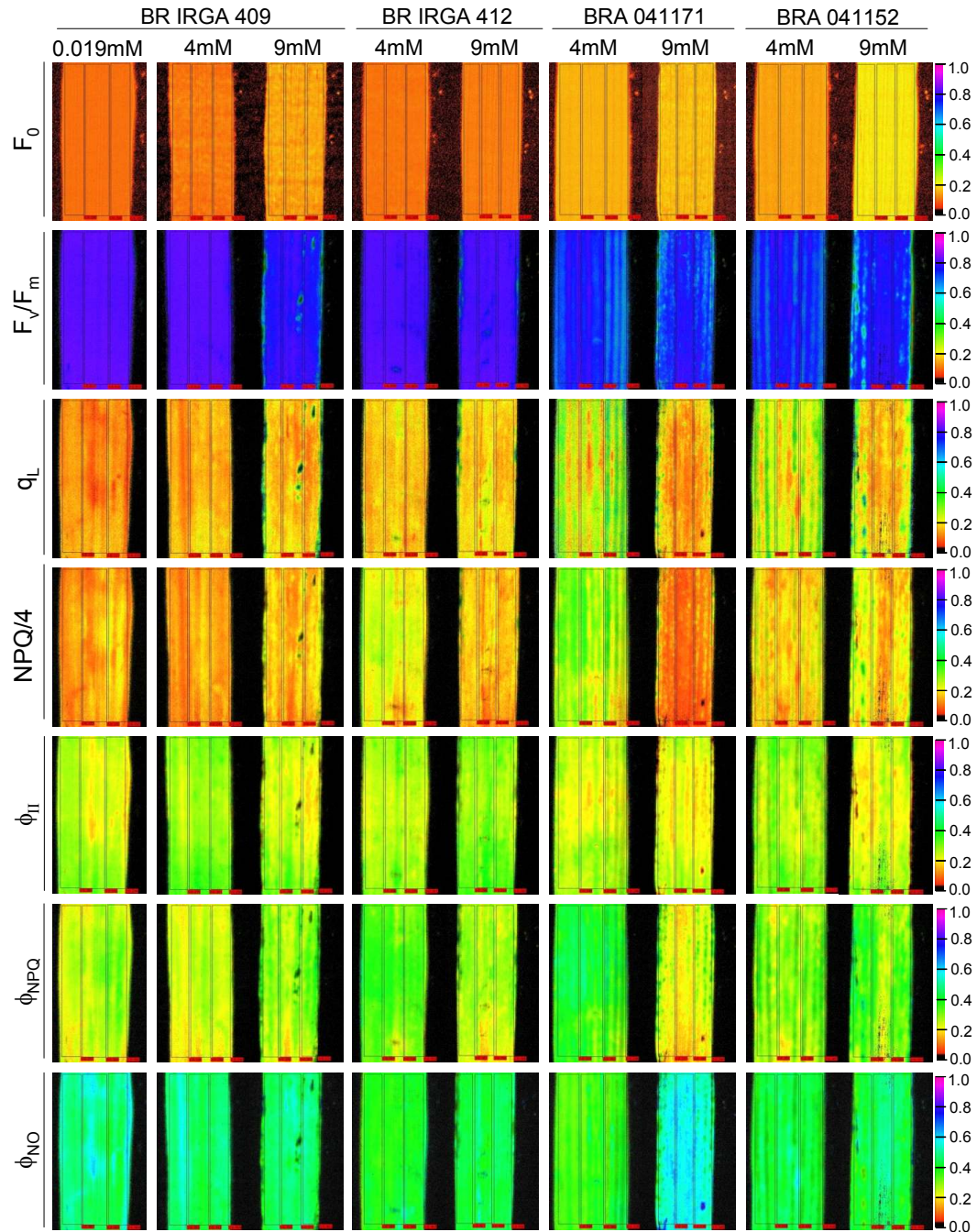


Figure 5: Chlorophyll a fluorescence images of minimal fluorescence (F_0), maximal PSII quantum yield (F_v/F_m), photochemical (q_L) and non-photochemical quenching ($NPQ/4$), quantum yield of photochemical energy conversion in PSII (ϕ_{PI}), quantum yield of regulated (ϕ_{NPQ}) and non-regulated (ϕ_{NO}) energy dissipation in PSII of four *O. sativa* genotypes treated with Fe-EDTA (4 and 9 mM) in nutrient solution. The false color code depicted at the bottom of images ranges from 0.000 (black) to 1.000 (pink).

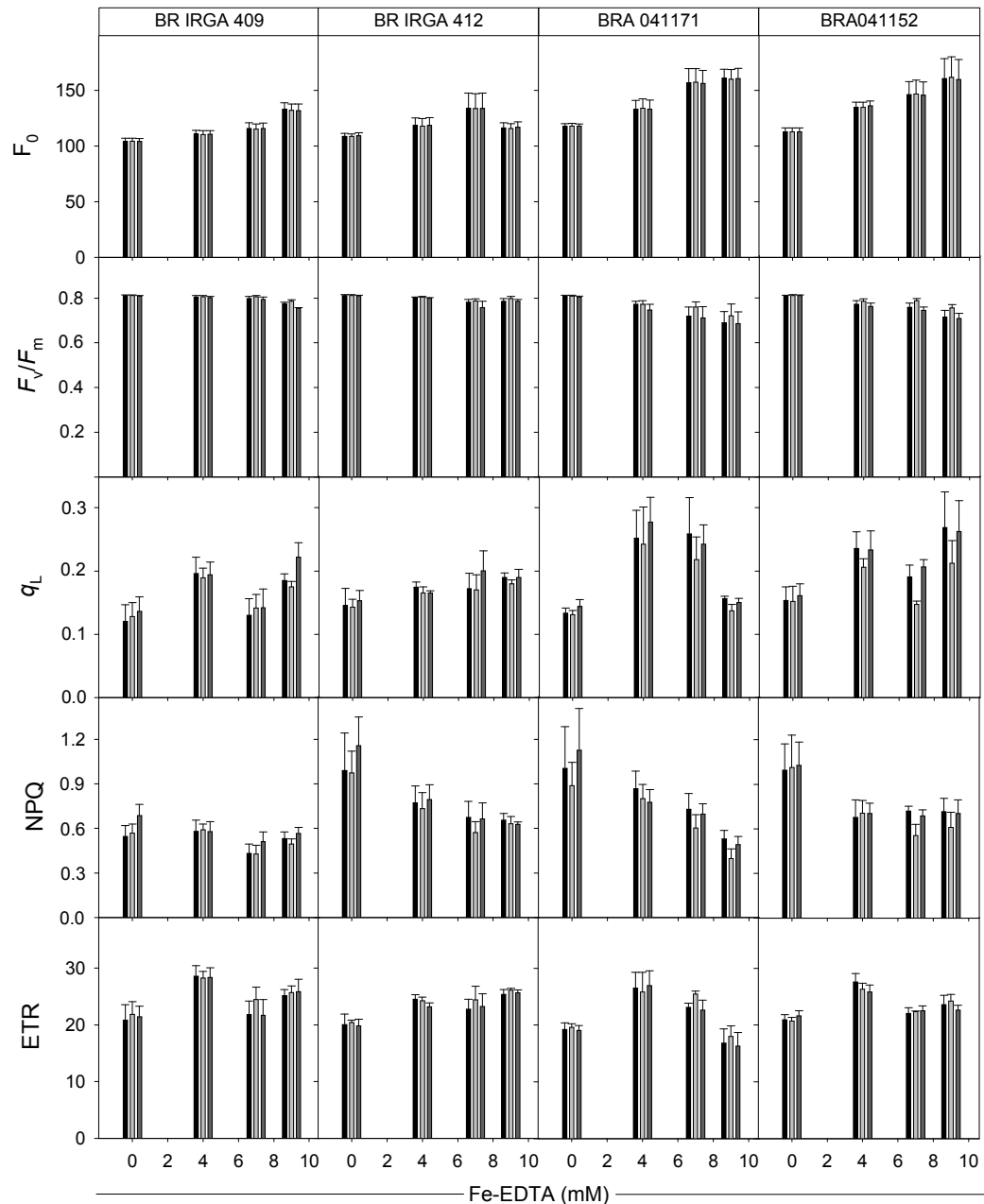


Figure 6: Minimal fluorescence (F_0), maximal PSII quantum yield (F_v/F_m), coefficient of photochemical quenching (q_L), non-photochemical quenching (NPQ) and apparent electron transport rate (ETR) in four rice genotypes treated with Fe-EDTA in nutrient solution. The parameters were taken using the Imaging-PAM fluorometer. The leaf was divided in three areas of interest: left side, center and right side, depicted as the three bars to each Fe-EDTA concentration, respectively. Data are means \pm SE of four replicates.

Changes in q_L over the leaf surface were observed only on the genotype BRA 041152 at higher iron doses. ETR did not change through over the leaf.

The quantum yield of photochemical energy conversion in PSII (ϕ_{II} ; or effective quantum yield of PSII – $\Delta F/F_m'$) reduced drastically in genotypes BRA

041171 and BRA 041152 in response to iron excess under high PPFD (Tab. 3). These reductions in ϕ_{II} come together with increases in quantum yield of regulated non-photochemical energy loss in PSII (ϕ_{NPQ}); ϕ_{NO} remained practically unchanged (Tab. 3). However, it was observed an increase in ϕ_{NO} values in the genotype BRA 041171 in higher iron doses, and reduction in ϕ_{NPQ} was detected in all genotypes under 9 mM Fe-EDTA treatment, but outstanding in the genotypes BRA 041152 and BRA 041171 (Fig. 8).

The genotypes BR IRGA 409 and BRA 041171 did not shown differences in ϕ_{NPQ} values over the light curve in imaging chlorophyll fluorescence measurements (Fig. 9). Only in higher PPFD was observed significant decrease in ϕ_{II} in the genotype BRA 041171, with considerable increase in ϕ_{NO} in both genotypes. Reduction in q_L was only detected at high PPFD. Under iron excess and low PPFD the genotype BRA 041171 show higher q_L values. This genotype also showed the lowest values of ETR at high PPFD (Fig. 9).

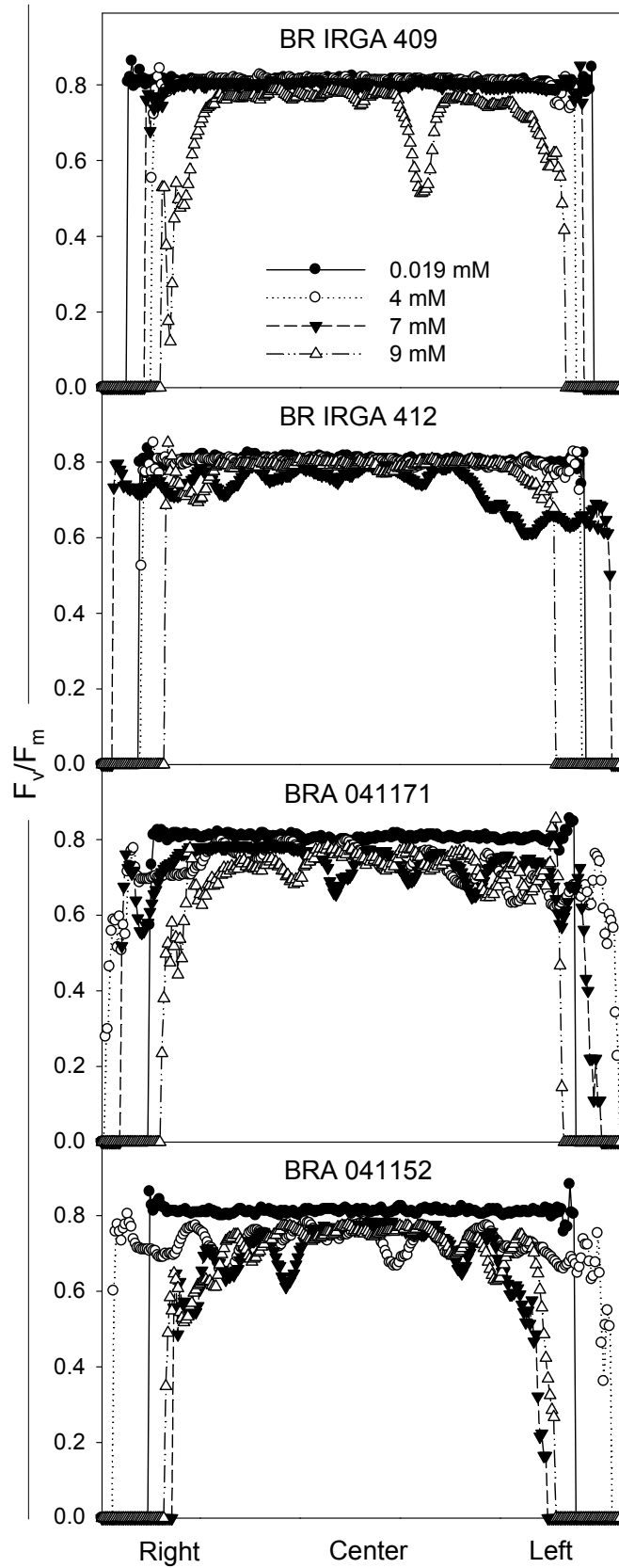


Figure 7: Spatial variation in maximal PSII quantum yield (F_v/F_m) across a transect in the leaf blade in four rice genotypes under different Fe-EDTA doses in nutrient solution. Data were taken from a representative replicate.

Table 3: Effects of iron treatments (Fe-EDTA) on chlorophyll a fluorescence parameters of four *O. sativa* genotypes: minimal fluorescence (F_0), maximal PSII quantum yield (F_v/F_m), photochemical (q_L) and non-photochemical quenching (NPQ), quantum yield of photochemical energy conversion in PSII (ϕ_{II}), quantum yield of regulated (ϕ_{NPQ}) and non-regulated (ϕ_{NO}) energy dissipation in PSII. The measurements were made under high light ($1000 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) using the Mini-PAM fluorometer. Data are mean \pm SE, n=4. Significant level: $p < 0.05$ (*); $p < 0.01$ (**); $p < 0.001$ (***); n.s. (not significant).

Genotype	Fe-EDTA	F_0	F_v/F_m	q_L	NPQ	ETR	ϕ_{II}	ϕ_{NPQ}	ϕ_{NO}
BR IRGA	0.019 mM	228.5 \pm 6.9	0.826 \pm 0.00	0.251 \pm 0.03 ^{Aa}	1.39 \pm 0.3	142.5 \pm 21 ^{Aa}	0.340 \pm 0.05 ^{Aa}	0.374 \pm 0.06 ^{Aa}	0.286 \pm 0.03
409	7 mM	241.0 \pm 2.8	0.821 \pm 0.00	0.325 \pm 0.07 ^{Aa}	1.94 \pm 0.2	137.4 \pm 11 ^{Aa}	0.326 \pm 0.03 ^{Aa}	0.441 \pm 0.01 ^{ABa}	0.233 \pm 0.02
BR IRGA	0.019 mM	232 \pm 3.9	0.824 \pm 0.00	0.228 \pm 0.03 ^{Aa}	1.14 \pm 0.2	139.6 \pm 17 ^{Aa}	0.331 \pm 0.04 ^{Aa}	0.355 \pm 0.04 ^{Aa}	0.314 \pm 0.02
412	7 mM	248.5 \pm 3.5	0.814 \pm 0.01	0.265 \pm 0.05 ^{ABa}	1.54 \pm 0.1	130.2 \pm 12 ^{Aa}	0.305 \pm 0.03 ^{ABa}	0.420 \pm 0.02 ^{Ba}	0.276 \pm 0.02
BRA	0.019 mM	229.5 \pm 8.8	0.821 \pm 0.01	0.354 \pm 0.05 ^{Aa}	1.25 \pm 0.1	172.2 \pm 9 ^{Aa}	0.412 \pm 0.02 ^{Aa}	0.321 \pm 0.01 ^{Aa}	0.267 \pm 0.03
041171	7 mM	251.5 \pm 5.9	0.794 \pm 0.01	0.197 \pm 0.05 ^{ABb}	2.55 \pm 0.5	79.0 \pm 19 ^{Bb}	0.185 \pm 0.05 ^{BCb}	0.572 \pm 0.07 ^{Ab}	0.243 \pm 0.04
BRA	0.019 mM	237 \pm 2.6	0.815 \pm 0.01	0.351 \pm 0.02 ^{Aa}	1.51 \pm 0.3	164.7 \pm 4 ^{Aa}	0.387 \pm 0.01 ^{Aa}	0.359 \pm 0.04 ^{Aa}	0.255 \pm 0.03
041152	7 mM	243.8 \pm 5.9	0.805 \pm 0.01	0.166 \pm 0.01 ^{Bb}	2.52 \pm 0.7	75.5 \pm 13 ^{Bb}	0.179 \pm 0.03 ^{Cb}	0.557 \pm 0.08 ^{ABb}	0.264 \pm 0.05
<i>Analysis of variance</i>									
Fe-EDTA (Fe)		***	*	n.s.	***	***	***	***	n.s.
Genotype (G)		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Fe \times G		n.s.	n.s.	**	n.s.	**	**	*	n.s.
Block		n.s.	n.s.	n.s.	*	*	*	**	**

To q_L , ETR, ϕ_{II} and ϕ_{NPQ} means followed by the same letters are not significantly different by Tukey's test at 5% of probability. Capital letters compare genotypes and small letters compare Fe-EDTA treatments.

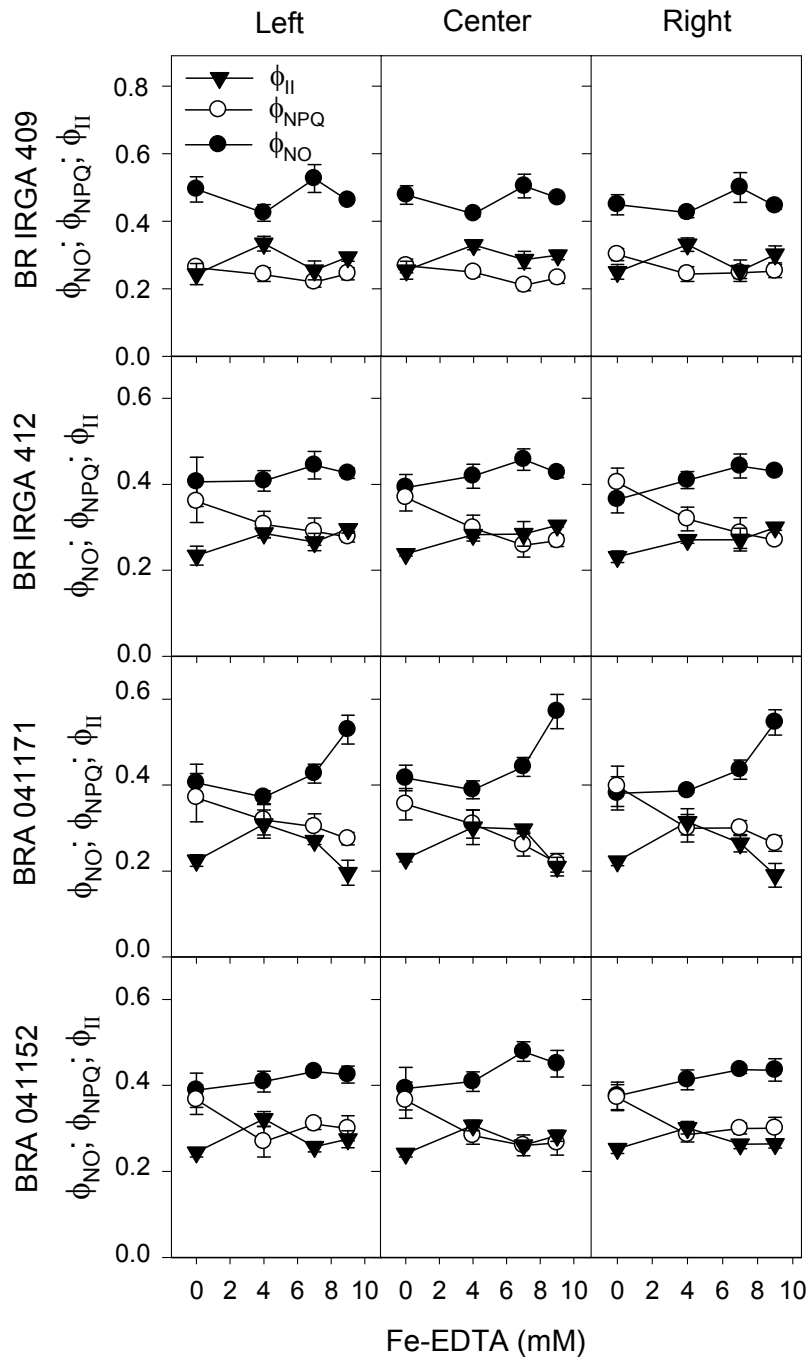


Figure 8: Relationship among quantum yield of photochemical energy conversion in PSII (ϕ_{II}), quantum yield of regulated (ϕ_{NPQ}) and non-regulated (ϕ_{NO}) energy dissipation in PSII of four rice genotypes treated with Fe-EDTA in nutrient solution. The parameters were taken using the Imaging-PAM fluorometer. The leaf was divided in three areas of interest: left side, center and right side. Data are means \pm SE of four replicates.

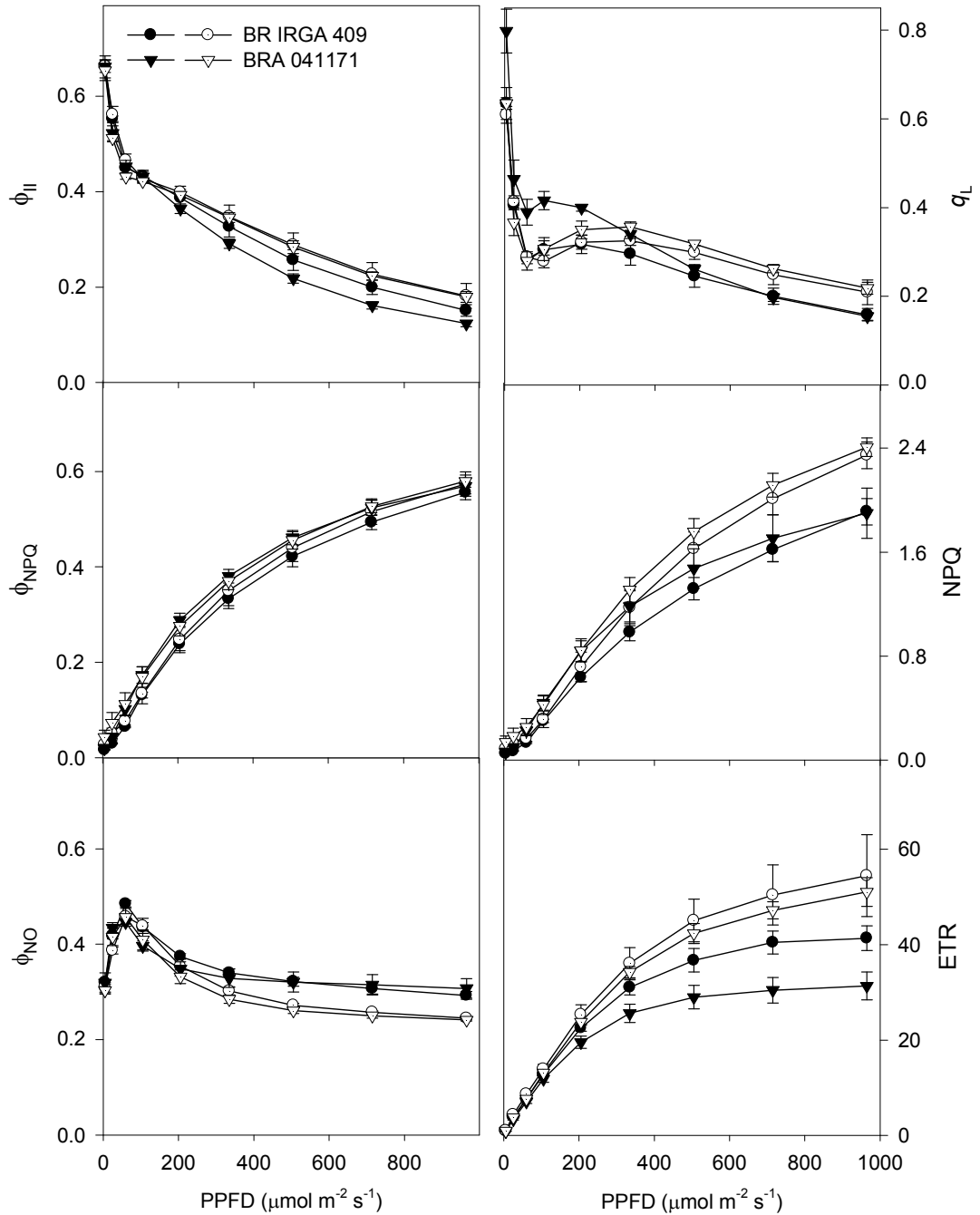


Figure 9: Light response curve of fluorescence parameters of the rice genotypes BR IRGA 409 (circles) and BRA 041171 (inverted triangles) under control conditions (Fe-EDTA 0.019 mM; open symbols) and under 7 mM Fe-EDTA (closed symbols) in nutrient solution. Quantum yield of photochemical energy conversion in PSII (ϕ_{II}), quantum yield of regulated (ϕ_{NPQ}) and non-regulated (ϕ_{NO}) energy dissipation in PSII, coefficient of photochemical quenching (q_L), non-photochemical quenching (NPQ) and apparent electron transport rate (ETR). Data are means \pm SE of four replicates

Discussion

All four rice genotypes showed iron shoot content above the critical level for iron toxicity ($>0,3-0,5 \text{ mg g}_{\text{DW}}^{-1}$; Sahrawat *et al.*, 1996; Dobermann and Fairhurst, 2000). Iron toxicity effects, however, were more severe in the genotypes BRA 041171 and BRA 041152, higher iron accumulators. Most of the non-invasive physiological parameters used, like A , F_v/F_m , ϕ_{II} , SPAD index and others, were efficient to differentiate the rice genotypes responses under iron excess and showed strict relation to the shoot iron content.

Resistance to ferrous iron may involve its oxidation at the root level using oxygen transported from the shoots to the roots via the aerenchyma and Fe^{3+} deposition at the root surface in an iron plaque (Liu *et al.*, 2004). As soon as the iron toxicity effect increases it was observed reduction in the number of lateral roots in all genotypes, reducing the root oxidizing power (Tab. 1). The black stain, composed by Fe sulfide, is an indication of excessive reduced conditions and Fe toxicity (Dobermann and Fairhurst, 2000). Our data did not allow us to differentiate iron plaque formation among genotypes. The washing method used probably was not enough to remove the iron at the root surface and intercellular spaces, allowing overestimating of iron content in root cells.

It has been reported that tissue iron concentrations, leaf bronzing index and root oxidation power did not completely indicate the plant physiological tolerance status. Leaf bronzing in rice may appear in leaf iron content as low as $0.108 \text{ mg g}_{\text{DW}}^{-1}$ to $0.250 \text{ mg g}_{\text{DW}}^{-1}$ (Genon *et al.*, 1994; Ramirez *et al.*, 2002). *Oryza glaberrima*, however, accumulate more than $2.2 \text{ mg g}_{\text{DW}}^{-1}$ in leaves without exhibiting any Fe-toxicity symptoms (Majerus *et al.*, 2007a). Genotypes with different sensitivity to iron excess can show similar shoot iron content, above the toxicity limit (Sahrawat *et al.*, 1996). The genotype BR IRGA 409 is commonly pointed out as susceptible to iron toxicity (Stein *et al.*, 2009). The classification criterion for tolerant rice genotypes, however, is based only in visual toxicity symptoms (EMBRAPA, 1980; Fageria *et al.*, 2008). That genotype, in spite of bronzing, showed high productivity in the field under iron excess (Wehr *et al.*, unpublished).

The ability of rice to cope with high external iron may be the result of avoidance and/or tissue tolerance strategies (Majerus *et al.*, 2007b). The former

seems to be linked to activation of antioxidative mechanisms (Vansuyt *et al.* 1997, Becana *et al.* 1998) and induction of ferritin synthesis and control of iron homeostasis which protect plant cells against oxidative stress (Ravet *et al.*, 2009). All these responses may be involved in prevent chlorophyll degradation under intermediate iron doses in all genotypes and more effectively in the genotype BR IRGA 412 (Fig. 2). The results obtained with the SPAD-502 chlorophyll meter showed direct relation with genotypes net photosynthesis (Fig. 3A).

The sudden decrease in net photosynthesis up to the 4 mM dose can be connected to stomatal limitation, as assessed by lower values of g_s and C_i/C_a ratio at this dose (Fig. 3). At further increase in Fe-EDTA dose, the increase in internal CO_2 concentration indicates that both stomatal and non-stomatal limitations were responsible for the inhibition of photosynthesis. The non-stomatal limitation appear more severely in genotypes BRA 041171 and BRA 041152, that showed higher C_i/C_a values and lower PSII quantum efficiency (F_v/F_m and ϕ_{II}) at the higher iron dose. No significant differences of g_s were observed among the genotypes (Fig. 3B). The non-stomatal limitation may be an explanation for the significant differences in net photosynthesis observed at 7 mM dose between the genotypes BRA 041171 and BR IRGA 409, with increasing PPF (Fig. 4).

Iron is transported to the shoots through the transpiration stream by xylem (Curie and Briat, 2003). The decreased g_s also lead to lowering transpiration rate, diminishing iron excessive absorption. Consequently, more sensitive plants showed leaf tips with burned and dry aspect. Stomata closure can, indirectly, lead to oxidative stress through over reduction of the electron transport chain and photoinhibition, contributing subsequently to the non-stomatal effects on photosynthesis.

Non-stomatal limitation can be attributed to the reactive oxygen species (ROS) generation in Fenton reaction under excessive Fe^{2+} , leading to membrane phospholipid peroxidation (Vansuyt *et al.* 1997; Becana *et al.*, 1998; Fang *et al.*, 2001). This effect may occur mainly in chloroplasts, when more than 90% of iron in leaf cells is located (Terry and Abadia, 1986), causing impairment in generation of proton-motive force in photosynthesis. Chlorophyll molecules are also susceptible to the ROS action, and can be degraded as a consequence of iron induced oxidative stress (Gallego *et al.*, 1996; Sinha *et al.*, 1997; Vansuyt *et al.*, 1997). Data on chlorophyll fluorescence were consistent with these findings.

The parameter F_0 represents the emission of excited antenna chlorophyll *a* molecules before the excitation migrates to the reaction centers and it is independent of photochemical events (Krause and Weis, 1991). The increased F_0 induced by iron excess in the genotypes BRA 041171 and BRA 041152 indicates impairment in energy transfer from antenna pigments to the reaction center (Fig. 5 & 6; Tab. 3). Moreover, the iron stressed plants showed high susceptibility to photoinhibition with reduction of PSII effectiveness in the primary photochemical reactions (F_v/F_m ; Fig. 6 & 7), reduced net photosynthesis as assessed by the light curve (Fig. 4) and unable of quenching excessive light by photoprotective processes (NPQ; Fig. 9).

The transient increase in q_L and ϕ_{II} under moderate Fe-EDTA doses (Fig. 6) and under low light (Fig. 9) also suggest the action of alternative electrons sink other than photosynthesis. Some cellular processes can constitute alternative sink for electrons, such as photorespiration (Wingler *et al.*, 2000), water-water cycle (Asada, 2000) or cyclic electron flow (Heber, 2002). In fact, the genotypes BR IRGA 409 and BRA 041171 did not reduce J_t and showed increased photorespiration rate (Tab. 2) due to iron excess. The substitution of O_2 for CO_2 contributes significantly to maintain the partial oxidation of the PSII acceptors when CO_2 availability is restricted by stomatal closure (Ort and Baker, 2002). Alternatively, it is possible that in spite of the photoprotective dissipation of excess excitation indicated by the fluorescence changes, photorespiration also restricts photosynthesis under conditions that lead to a high oxygenation of rubisco (Nunes-Nesi *et al.*, 2008) such as iron excess, that lead to stomatal and non-stomatal limitations on photosynthesis.

The relative importance of J_c is indicated by the ratio J_c/J_t (Tab. 2) which was decreased by iron excess ($p < 0.001$) and show slight difference between genotypes ($p < 0.06$). The differences found between genotypes with respect to J_c , q_L and ϕ_{II} under iron excess condition also indicate an alternative electron sink than photorespiration (Tab. 2, Fig. 9). An excessive iron load in plant tissue can give rise to a significant increase in cytochrome b_6/f complex (Cyt b_6/f) content in thylakoids (Suh *et al.*, 2002). It potentially increases the electron flow and keep plastoquinone *a* (Q_a) in an oxidized state (assuming that there is no obstruction to the electron flow from Q_a to Cyt b_6/f), which may explain higher values of q_L at moderate iron doses and under low PPFD in the light curve (Fig. 6 and Fig. 9).

However, assessing cyclic electron flow with non-invasive chlorophyll fluorescence methodology, it was found significant differences between genotypes, but not between Fe-EDTA doses (data not shown). The Mehler-ascorbate peroxidase reaction has been recognized as a photon protective reaction (Asada, 2000). Although the contribution of this reaction was not taken account in our calculations, it may have importance in dissipating excess of energy. The oxidative damage on thylakoid membrane, however, impose limitations to the electron flow, leading to an “electron traffic jam” through photosynthetic electron transport chain, and consequently culminating to reductions in q_L and ETR values of sensitive genotypes under high PPFD (Tab. 3, Fig. 9).

The genotypes showed great differences in their ability to cope with excess energy. While some genotypes were able to maintain high ϕ_{II} under excess of iron (BR IRGA 412) or show little reduction even under high PPFD (BR IRGA 409), the higher iron accumulators genotypes (BRA 041171 and BRA 041152) severely reduced the energy fraction used in photochemistry (ϕ_{II}) under high PPFD (Tab. 3, Fig. 9). These reductions in ϕ_{II} were compensate with an increase in ϕ_{NPQ} (Tab. 3, Fig. 9), as a result of thermal dissipation probably through xantophyll cycle activation under high PPFD (Cruz *et al.*, 2005); or were compensate with increases in ϕ_{NO} (Fig. 8 and Fig. 9). The rise in ϕ_{NO} observed especially to the genotype BRA 041171 in high iron dose or under high PPFD, indicates that both photochemical energy conversion and protective regulatory mechanisms are inefficient (Fig. 8 and Fig. 9).

In conclusion, it has been demonstrated that rice photosynthesis is sensitive to the iron excess, through initial stomatal limitation or, in a more severe degree, due both stomatal and non-stomatal limitation caused by oxidative damage and impairment in light utilization. The results showed the usefulness of non-invasive physiological measurements to understanding the rice photosynthetic response to iron toxicity. Thus, photosynthetic non-destructive parameters appear as an unavailable tool in genotype selection to intensify the use of iron-toxic wetlands in the near future, inevitable to attend the food needs of the ever-growing population in tropical regions.

Acknowledgements

We thank to Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) and Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG) for providing us with rice seeds. This investigation was supported by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (PROCAD/CAPES grant number 0361054/2005) and Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG grant number APQ-1011-3.08/07), Brazil.

References

- Asada K.** 2000. The water–water cycle as alternative photon and electron sinks. *Philos. Trans. Royal Society London B Biological Science* **355**, 1419–1431.
- Asch F, Becker M, Kpongor DS.** 2005. A quick and efficient screen for resistance to iron toxicity in lowland rice. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* **168**, 764–773.
- Becana M, Moran JF, 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-condition and management concepts. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* **168**, 558–573.
- 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.
- Bolhàr-Nordenkampf HR, Long SP, Baker NR, Öquist G, Schreiber U, Lechner EG.** 1989. Chlorophyll fluorescence as a probe of the photosynthetic competence of leaves in the field: a review of current instrumentation. *Functional Ecology* **3**, 497–514.
- Counce PA, Keisling TC, Mitchell A.J** 2000. A uniform, objective and adaptive system for expressing rice development. *Crop Science* **40**, 436–443.
- Cruz JA, Avenso TJ, Kanazawa A, Takizawa K, Edwards GE, Kramer DM.** 2005. Plasticity in light reactions of photosynthesis for energy production and photoprotection. *Journal of Experimental Botany* **56**, 395–406.
- Curie C, Briat JF.** 2003. Iron transport and signaling in plants. *Annual Review of Plant Biology* **54**, 183–206.
- Di Marco G, Iannelli MA, Loreto F** 1994. Relationship between photosynthesis and photorespiration in field-grown wheat leaves. *Photosynthetica* **30**, 45–51.
- Dobermann A, Fairhurst T.** 2000. *Rice: Nutrient Disorders & Nutrient Management*. Potash and Phosphate Institute, Potash and Phosphate Institute of Canada, and International Rice Research Institute, Singapore. 191pp.
- Dorlodot S, Lutts S, Bertin P.** 2005. Effects of ferrous iron toxicity on the growth and mineral composition of an interspecific rice. *Journal of Plant Nutrition* **28**, 1–20.
- EMBRAPA** 1980. *Metodologia para avaliação das cultivares de arroz e feijão, para condições adversas de solo*. Circular técnica EMBRAPA-CNPAF, n. 8.
- Fageria NK, Rabelo NA.** 1987. Tolerance of rice cultivars to iron toxicity. *Journal of Plant Nutrition* **10**, 653–661.
- Fang WC, Wang JW, Lin CC, Kao CH.** 2001. Iron induction of lipid peroxidation and effects on antioxidative enzyme activities in rice leaves. *Plant Growth Regulation* **35**, 75–80.

- Gallego SM, Benavides MP, Tomaro ML.** 1996. Effect of heavy metal ion excess on sunflower leaves: evidence for involvement of oxidative stress. *Plant Science* **121**, 151–159.
- Genon J, Hecpée N, Duffey J, Delvaux B, Hennebert P.** 1994. Iron toxicity and other chemical soil constraints to rice in highland swamps of Burundi. *Plant and Soil* **166**, 109–115.
- Genty B, Briantais JM, Baker NR.** 1989. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta* **990**, 87–92.
- Genty B, Harbinson J, Cailly AL, Rizza F.** 1996. *Fate of excitation at PS II in leaves: the non-photochemical side*. Presented at The Third BBSRC Robert Hill Symposium on Photosynthesis, March 31 to April 3, 1996, University of Sheffield, Department of Molecular Biology and Biotechnology, Western Bank, Sheffield, UK, Abstract no. P28
- Guerinot ML, Yi Y.** 1994. Iron: Nutritious, noxious, and not readily available. *Plant Physiology* **104**, 815–820.
- Heber U.** 2002. Irrungen, Wirrungen? The Mehler reaction in relation to cyclic electron transport in C3 plants. *Photosynthesis Research* **73**, 223–231.
- Hoagland DR, Arnon DI.** 1938. *The method for growing plants without soil: water-culture*. Berkeley: Univ. of California, 32pp. Circular of the Agricultural Experimentation Station.
- Hubbart S, Peng S, Horton P, Chen Y, Murchie EH.** 2007. Trends in leaf photosynthesis in historical rice varieties developed in the Philippines since 1996. *Journal of Experimental Botany* **58**, 3429–3438.
- Iqbal RM, Rao, AR, Rasul E, Wahid A.** 1997. *Mathematical models and response functions in photosynthesis: an exponential model*. In: Pessaraki, M. (Ed.), Handbook of photosynthesis. Marcel Dekker Inc., New York, USA, pp. 803–810.
- Kampfenkel K, Montagu MV, Inzé D.** 1995. Effects of Iron Excess on *Nicotiana plumbagnifolia* Plants: Implications to Oxidative Stress. *Plant Physiology* **107**, 725–735.
- Kitajima M, Butler WL.** 1975. Quenching of chlorophyll fluorescence and primary photochemistry in chloroplasts by dibromothymoquinone. *Biochimica et Biophysica Acta* **376**, 105–115.
- Klughammer C, Schreiber U.** 2008. Complementary PSII quantum yields calculated from simple fluorescence parameters measured by PAM fluorometry and the Saturation Pulse method. *PAM Application Notes* **1**, 27–35. http://www.walz.com/e_journal/pdfs/PAN078007.pdf
- Kramer DM, Johnson G, Kiirats O, Edwards GE.** 2004. New fluorescence parameters for the determination of Q_A redox state and excitation energy fluxes. *Photosynthesis Research* **79**, 209–218.
- Krause GH, Weis E.** 1991. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **42**, 313–349.

- Lavergne J, Trissl HW.** 1995. Theory of fluorescence induction in photosystem II: Derivation of analytical expressions in a model including exciton-radical-pair equilibrium and restricted energy transfer between photosynthetic units. *Biophysical Journal* **68**, 2474–2492.
- Liu WJ, Zhu YG, Smith FA, Smith SE.** 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.
- Luo A, Jing G, Wu P, Ni J, Jiang S, Zhang Y.** 1997. Rice genotype differences in nutrient status under excessive ferric-iron conditions. *Journal of Plant Nutrition* **20**, 1361–1373.
- Majerus V, Bertin P, Lutts S.** 2007a. Effects of iron toxicity on osmotic potential, osmolytes and polyamines concentrations in the African rice (*Oryza glaberrima* Steud.). *Plant Science* **173**, 96–105.
- Majerus V, Bertin P, Swenden V, Fortemps A, Lobréaux S, Lutts S.** 2007b. Organ-dependent responses of the African rice to short-term iron toxicity: ferritin regulation and antioxidative responses. *Biologia Plantarum* **51**, 303–312.
- Melis A, Spangfort M, Andersson B.** 1987. Light-absorption and electron-transport balance between photosystem II and photosystem I in spinach chloroplasts. *Photochemistry and Photobiology* **45**, 129–136.
- Nunes-Nesi A, Sulpice R, Gibon Y, Fernie AR.** 2008. The enigmatic contribution of mitochondrial function in photosynthesis. *Journal of Experimental Botany*, **59**, 1675–1684.
- Ort DR, Baker NR.** 2002. A photoprotective role of O₂ as an alternative electron sink in photosynthesis? *Current Opinion in Plant Biology* **5**, 193–198.
- Ottow JCG, Benckiser G, Watanabe I, Santiago S.** 1983. Multiple nutritional soil stress as the prerequisite for iron toxicity of wetland rice (*Oryza sativa* L.). *Tropical Agriculture* **60**, 102–106.
- Oxborough K, Baker NR.** 1997. Resolving chlorophyll *a* fluorescence images of photosynthetic efficiency into photochemical and non-photochemical components – calculation of q_p and F_v'/F_m' without measuring F_0' . *Photosynthesis Research* **54**, 135–142.
- Oxborough K.** 2004. Imaging of chlorophyll *a* fluorescence: theoretical and practical aspects of an emerging technique for the monitoring of photosynthetic performance. *Journal of Experimental Botany* **55**, 1195–1205.
- Ramírez LM, Claassen N, Unieira AA, Werner H, Moawad AM.** 2002. Effect of phosphorus, potassium and zinc fertilizers on iron toxicity in wetland rice (*Oryza sativa* L.). *Plant and Soil* **239**, 197–206.
- Ravet K, Touraine B, Boucherez J, Briat JF, Gaymard F, Cellier F.** 2009. Ferritins control interaction between iron homeostasis and oxidative stress in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **57**, 400–412.
- Sahrawat KL, Mulbah CK, Diatta S, Delaune RD, Patrick WH, Singh BN, Jones MP.** 1996. The role of tolerant genotypes and plant nutrients in the management of iron toxicity in lowland rice. *Journal of Agricultural Science* **126**, 143–149.

- 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.
- Stein RJ, Duarte GL, Spohr MG, Lopes SIG, Fett JP.** 2009. Distinct physiological responses of two rice cultivars subjected to iron toxicity under field conditions. *Annals of Applied Biology* **154**, 269–277.
- Suh H, Kim CS, 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, Abadia J.** 1986. Function of iron in chloroplasts. *Journal of Plant Nutrition* **9**, 609–646.
- Valentini R, Epron D, De Angelis P, Matteucci G, Dreyer E.** 1995. In situ estimation of net CO₂ assimilation, photosynthetic electron flow and photorespiration in Turkey oak (*Q. cerris* L.) leaves: diurnal cycles under different levels of water supply. *Plant Cell and Environment* **18**, 631–640.
- Vansuyt G, Lopez F, Inzé D, Briat JF, Fourcroy P.** 1997. Iron triggers a rapid induction of ascorbate peroxidase gene expression in *Brassica napus*. *FEBS Letter* **410**, 1195–1200.
- Wingler A, Lea PJ, Quick WP, Leegood RC.** 2000. Photorespiration: Metabolic pathways and their role in stress protection. *Philos. Trans. Royal Society London B Biological Science* **355**, 1517–1529.

4. CAPÍTULO 2

Iron plaque formation and nutritional disorders in tropical rice genotypes from lowland and upland cropping systems

Abstract In irrigated systems, iron plaque is frequently formed on the root surface of rice. Oxygen is transferred from the aerial parts to the roots via aerenchyma, resulting in the oxidation of ferrous to ferric iron and the precipitation of iron oxides or hydroxides on root surfaces. The iron plaque formation was investigated in four Brazilian lowland and upland rice genotypes and also in the genotype Nipponbare. Thirty days old plants from the lowland cropping system (BRS Atalanta and Epagri 107) and upland cropping system (Canastra) or both systems (BRSMG Curinga) and the cultivar Nipponbare were exposed to iron excess (4 mM FeSO₄) for seven days in full strength Hoagland nutrient solution, pH 5.5. In all genotypes it was observed iron plaque formation, mainly on the maturation region of the roots, with few iron crystals over the root apex. The lowland genotypes showed higher Fe content in iron plaque. The irregular deposition pattern of iron over the surface of roots covered the limit of the cells epidermis. Frequently it was observed ruptures of the root epidermis as a result of iron toxicity. The root exodermis may be contributed to prevent the deposit of iron in the cortex of the lowland genotypes and the genotype BRSMG Curinga. However, for the upland genotype Canastra, probably the exodermis was not able to obstruct the iron deposit in the cortex. The highest leaf iron content was found in Epagri 107, a genotype frequently considered as iron-tolerant. It was observed in plants with iron plaque formation significant reductions in the shoot content of phosphorous, manganese and magnesium and a slightly increase in zinc content. The differences of iron plaque formation among the genotypes from upland and lowland systems may be an indicative of differences in exodermis selectivity, root oxidative capacity and iron nutrition mechanisms.

Key words: Iron toxicity, *Oryza sativa*, scanning electron microscopy, histochemistry.

Formação da placa de ferro e desordens nutricionais em genótipos tropicais de arroz oriundos de sistemas de cultivo de várzea e terras altas

Resumo Em sistemas de cultivo irrigado, frequentemente ocorre a formação da placa de ferro na superfície das raízes de arroz. O oxigênio é transferido da parte aérea para as raízes via aerênquima, resultando na oxidação do ferro na forma ferrosa para férrica e a precipitação de óxidos e hidróxidos de ferro nas superfícies radiculares. A formação da placa de ferro foi investigada em quatro genótipos brasileiros oriundos de cultivo em terras altas e várzea, e também no genótipo Nipponbare. Plantas de trinta dias de idade do sistema de cultivo em várzea (BRS Atalanta e Epagri 107) e do sistema de cultivo em terras altas (Canastra) ou de ambos os sistemas de cultivo (BRSMG Curinga) e o genótipo Nipponbare foram expostas ao excesso de ferro (FeSO_4 4mM) por sete dias em solução nutritiva de Hoagland em força total, pH 5,5. Em todos os genótipos foi observada a formação da placa de ferro, principalmente na região de maturação das raízes, com poucos cristais de ferro no ápice radicular. Os genótipos de várzea apresentaram os maiores teores de ferro na placa. O padrão de deposição irregular do ferro na superfície radicular cobriu o limite das células epidérmicas. Rupturas na epiderme radicular foram frequentemente observadas, como resultado da toxidez por ferro. A exoderme das raízes pode ter contribuído para prevenir o depósito de ferro no córtex dos genótipos de várzea e do genótipo BRSMG Curinga. Entretanto, no genótipo de terras altas Canastra, provavelmente, a exoderme não foi capaz de impedir o depósito de ferro no córtex radicular. O maior teor de ferro foi observado em Epagri 107, um genótipo frequentemente considerado tolerante ao ferro. Foi observado em plantas com formação da placa de ferro reduções significativas no conteúdo de fósforo, manganês e manganésio, além de um leve aumento no teor de zinco. As diferenças na formação da placa de ferro entre os genótipos de várzea e terras altas pode ser um indicativo de diferenças na seletividade da exoderme, capacidade oxidativa das raízes e diferentes mecanismos da nutrição de ferro.

Palavras-chave: Toxidez por ferro, *Oryza sativa*, microscopia eletrônica de varredura, histoquímica.

Introduction

The formation of iron plaque on the root surface of rice (*Oryza sativa* L.) is commonly related to the lowland rice-cropping system. The aerenchyma in wetland plant species is responsible to transfer O₂ from the aerial parts to the roots. The release of O₂ and oxidants into the rhizosphere and the subsequent oxidation of ferrous to ferric iron result in the precipitation of iron oxide or hydroxide on the root surface (Chen *et al.*, 1980b).

The composition of iron plaque includes mainly ferrihydrite (63%) with lesser amounts of goethite (32%) and minor proportion of siderite (5%; Hansel *et al.*, 2001). Iron hydroxides have high capacity to sequester ions from rhizosphere by adsorption or co-precipitation (Liu *et al.*, 2008). Iron plaque has been reported to reduce nutrient supply to the plant by immobilizing nutrients, resulting in nutrient deficiency (Howeler, 1973; Batty *et al.*, 2000). On the contrary, others reports suggested that iron plaque can act as a nutrient reservoir during reduced supply (Bienfait *et al.*, 1984; Conlin and Crowder, 1989; Greipsson and Crowder, 1992). Some other experiments showed no change on the nutrient status (Greipsson and Crowder, 1992; Ye *et al.*, 1998). Iron plaque can also, act as a barrier to the uptake of heavy metals and phytotoxic metalloids into rice tissues (Greipsson 1995; Batty *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2006) or alternatively, as a pool that enhance the uptake of toxic metals (Otte *et al.*, 1989; Zhang *et al.*, 1998; Batty *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2006).

Nevertheless, the effects of iron plaque on plant nutrition may depend mainly on the amount of iron precipitated on the roots (Otte *et al.*, 1989; Zhang *et al.*, 1998), but also on growth stage and soil type (Chen *et al.*, 1980b), on pH of the environment (Batty *et al.*, 2000) and on rice genotypes (Chen *et al.*, 1980a; Liu *et al.*, 2006).

Rice genotypes differ in their ability to release O₂ by roots to the rhizosphere, oxidizing Fe²⁺ and protecting plant from iron toxicity (Dobermann and Fairhurst, 2000). Rice genotypes also differ widely in iron excess tolerance (Fageria and Rabelo, 1987), but the differences between genotypes from different cropping systems to manage iron toxicity is unknown. The introduction of upland genotypes in lowland cropping system (Soares *et al.*, 2005; Adigbo *et al.*, 2007) requires a good control of iron homeostasis, by blocking excessive metal uptake

or avoiding toxic effects and preventing nutritional starvation. Uncover the differences in iron plaque formation and the ability to cope with iron excess of lowland and upland Brazilian genotypes may contribute to select plants with superior iron tolerance and is an important component of research for reducing iron toxicity.

The purpose of this study was to evaluate the differences in iron plaque formation in rice genotypes from different cropping systems and its effects on physiology, nutritional status and root anatomy.

Material and methods

Plant materials and experimental conditions

Seeds of four rice (*Oryza sativa* L.) genotypes were obtained from Brazilian breeding programs. It was used in this study the genotypes BRS Atalanta and Epagri 107 from lowland breeding system, the genotype Canastra from upland breeding system and the genotype BRSMG Curinga from upland, but that is commonly introduced to both cropping systems. The lowland genotype Nipponbare also was used.

Seeds were sterilized in 10% (v/v) sodium hypochlorite for 10 min followed by washing three times with deionized water. The seeds were germinated on water moist filter paper in a germination chamber under a 12 h photoperiod ($200\text{--}250\ \mu\text{mol m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$) regime at 28°C and 100% RH for 72h (Fig. 1). After germination, the seedlings were transferred to plastic pots (3.8 L) containing Hoagland nutrient solution (Hoagland and Arnon, 1938) with macronutrients (mM) in the following composition: NO_3 (14); NH_4 (1); K (6); Ca (4); Mg (2); P (1); S (2); and micronutrients (μM): Fe (19); B (46); Mn (9); Zn (0.8); Cu (0.3); Mo (0.1). The pH was adjusted daily to 5.5 with 1 M HCl or NaOH and no aeration was provided. Each pot contained 15 seedlings. The nutrient solution was renewed weekly until seedlings had 30 days of age (V6 growth stage; Counce *et al.*, 2000). After that, all seedlings were placed in deionized water for 12 h to minimize any interference of other elements with iron (Fe). For induction of iron plaque formation, the plants were treated with 4 mM $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ during 7 days. After the application of treatments the solution was

renewed every three days. A control treatment was carried out in standard Hoagland nutrient solution with 0.019 mM Fe-EDTA. The experiments were performed under greenhouse conditions (average annual temperature of 27.6 °C, and average relative humidity of 72%; Fig. 1).

The experiment followed a randomized block factorial (5×2) design with five genotypes and two iron treatments (FeSO₄ and control), with four replicates. When necessary the data were grouped into sub-divided parcels (each parcel representing the time of FeSO₄ exposition or the area of interest over the leaf surface in the chlorophyll *a* fluorescence measurements). The data were subjected to analysis of variance (ANOVA) and the means compared by Tukey's test at 5% of probability. Pearson's correlation test was used when required. All analysis was made using the software SAEG 9.1 - UFV.

Iron histochemistry and scanning electron microscopy

Root samples of the maturation zone (approx. 4 – 5 cm from apex) of the genotypes Epagri 107, BRS Atalanta, Canastra and BRSMG Curinga were collected after maximal exposition to the treatments (168 h) and fixed according to Karnovsky (1965). To SEM analysis, the material was dehydrated slowly in ethylic series and submitted to critical point drying using liquid CO₂ in Balzers equipment (model CPD 020, Bal-Tec, Balzers, Liechtenstein). The samples covered with gold using the cathodic spraying process in a Sputter Coater (model FDU010, Bal-Tec, Balzers, Liechtenstein) were observed and photographed using a scanning electron microscope (model Zeiss, LEO 1430 VP, Cambridge, England).

Iron histochemistry was made by making free-hand root transversal sections with a high quality stainless steel sectioning razor (model LPC, Rolemberg e Bhering Comércio e Importação LTDA, Belo Horizonte, Brazil). After washing with deionized water, the root sections, from both treatments, were submitted to the Perl's method (Meguro *et al.*, 2007). The samples were treated with a solution containing equal parts of 3% potassium ferrocyanide and 3% hydrochloric acid for a period of 30 minutes. The root cross sections were washed in deionized water and mounted in lamina with 50% glycerin and the formation of Prussian Blue was observed and photographed using a photonic microscope (model AX70TRF, Olympus Optical, Tokyo, Japan) with a U-Photo system. A

control treatment, without sample exposition to the Perl's method, was carried out under same conditions.

Plant growth, evaluation of root iron plaque formation and determination of minerals contents

Growth parameters and root iron plaque formation were evaluated at 12, 48, 96 and 168 h after FeSO_4 treatment. Two seedlings from each replication were randomly selected and divided into shoots and roots. After root and shoot length evaluation, the roots were washed with deionized water and the iron plaque was extracted using dithionite-citrate-bicarbonate (DCB) following the method of Taylor and Crowder (1983). The whole root system of each two seedlings was incubated for 60 min at room temperature in 50 mL of a solution containing 0.03 M sodium citrate ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) and 0.125 M sodium bicarbonate (NaHCO_3), with the addition of 1 g sodium dithionite ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$). Roots were rinsed three times with deionized water and added to the DCB extracts. The resulting solution was made up to 100 ml with deionized water. A blank with no roots was carried together. After DCB extraction, roots and shoots were dried at 75 °C until constant weight and determined dry weight.

After extraction, to avoid interferences with organic compounds, the DCB extracts were evaporated and the residuals were wet-digested in a nitric-perchloric acid solution (3:1) at 200 °C (Kampfenkel *et al.*, 1995). The same digestion procedure was made using an aliquot of the dry weight material. Total iron content in roots, shoots and in DCB extracts was determined by atomic absorption spectrophotometry (GBC Avanta, GBC Scientific Equipment Ltd, Australia). The content of phosphorous (P), magnesium (Mg), zinc (Zn), manganese (Mn) and copper (Cu) were also determined in shoots and in DCB extracts at the end of the exposure period (168 h).

Chlorophyll a fluorescence measurements

Chlorophyll fluorescence was imaged using the standard version of the Imaging-PAM (Heinz Walz GmbH, Effeltrich, Germany). For maximal spatial resolution, it was chose an imaged area of 20 × 30 mm to assess spatial heterogeneity of chlorophyll fluorescence parameters. This instrument employs the same blue LEDs for pulse modulated measuring light (at $0.5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$),

continuous actinic illumination ($415 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) and saturation pulses ($2400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). After plants were kept in darkness for 50 min, minimum (F_0) and maximum (F_m) fluorescence were recorded. The maximal photosystem II (PSII) quantum yield was determined as F_v/F_m (Kitajima and Butler, 1975), where F_v is the difference between F_0 and F_m . After illumination of the sample for 40 s, saturation pulse was applied in order to determine F_m' and steady-state F_s . The minimal fluorescence in a light-acclimated state (F_0') was calculated using the approximation of Oxborough and Baker (1997): $F_0' = F_0 / (F_m - F_0 / F_m + F_0 / F_m')$.

Besides the F_v/F_m , it was calculated the coefficient of photochemical (q_p) and non-photochemical quenching (NPQ; Bilger and Björkman, 1990). The apparent electron transport rate (ETR) was calculated as $\text{ETR} = 0.5 \times I_A \times \phi_{II} \times \text{PAR}$. Where 0.5 is the assumed proportion of absorbed quanta used by PSII reaction centres (Melis *et al.*, 1987) and I_A is the absorbed irradiance by the leaf measured by the Imaging-PAM fluorometer.

Results

Iron plaque formation, SEM and iron histochemistry

After FeSO_4 treatment application, iron plaque gradually became visible as a reddish coating on the root surface. The color of the iron plaque became darker reddish with increasing time of exposure to FeSO_4 .

The iron plaque was deposited with a definite zonation over the root, starting approximately from the root tips and darkening with distance from the tip, mainly on the maturation region of the roots (Fig. 1 F).



Figure 1: Iron plaque experiment. A: Rice seeds germination procedure in the germination chamber; B: Seedlings transferred to plastic pots (3.8 L) containing nutrient solution; C and D: Disposition of the pots on the bench in the greenhouse; E: Control treatment without iron plaque; F: 4 mM FeSO_4 treatment with iron plaque formation on root surface of the genotype Nipponbare.

Comparing the plaqued and unplaqued roots of the rice genotypes by SEM it is possible to detect clearly the presence of iron deposits on different sizes. Root surfaces of the control plants were virtually free of external deposits and there were root hairs with no signal of deformation (Fig. 2 A; C; E and G). In contrast, on the roots with iron plaque deposition the limit of the cells of epidermis was indiscernible. In these roots the iron plaque was unevenly distributed as crystals precipitated and amorphous coating on roots. In roots with iron plaque the epidermal cells provide a template for the massive coating of iron. In the roots of

all genotypes only under iron excess frequently it was observed ruptures of the root epidermis on the maturation zone (Fig. 2).

The localization of iron in the roots of rice genotypes was evaluated by the Perl's Prussian blue method (Fig. 3). The reaction in the control treatment was absent or little staining was detected. On the contrary, intense blue stain was observed in the roots of all rice genotypes under condition of iron plaque formation (Fig. 3).

Iron stain was detected in the root hairs, epidermis, hypodermis, exodermis (Fig. 3 B; D; F; H) and in the cortical parenchyma (Fig. 3 F). Intense reaction was observed in the roots of the genotype Canastra. The others genotypes presented positive reaction evident in root epidermis and exodermis (Fig. 3).

Dry weights and length of shoots and roots

Root and shoot dry weights increased along the time of iron plaque formation in all the genotypes (Fig. 4). However, no significant interactions between Fe treatments and time of exposition were observed (Tab. 1). In general, iron plaque formation lead to significant reductions in the length and dry weights of shoots, but without differences in the length and dry weights of roots (Fig. 4; Tab. 1).

The genotypes differed in all growth parameters (Tab. 1). Nipponbare and Epagri 107 presented the slightest shoots. The genotype Curinga showed higher shoot length and dry weight but with lower length of roots together with Nipponbare (Fig. 4).

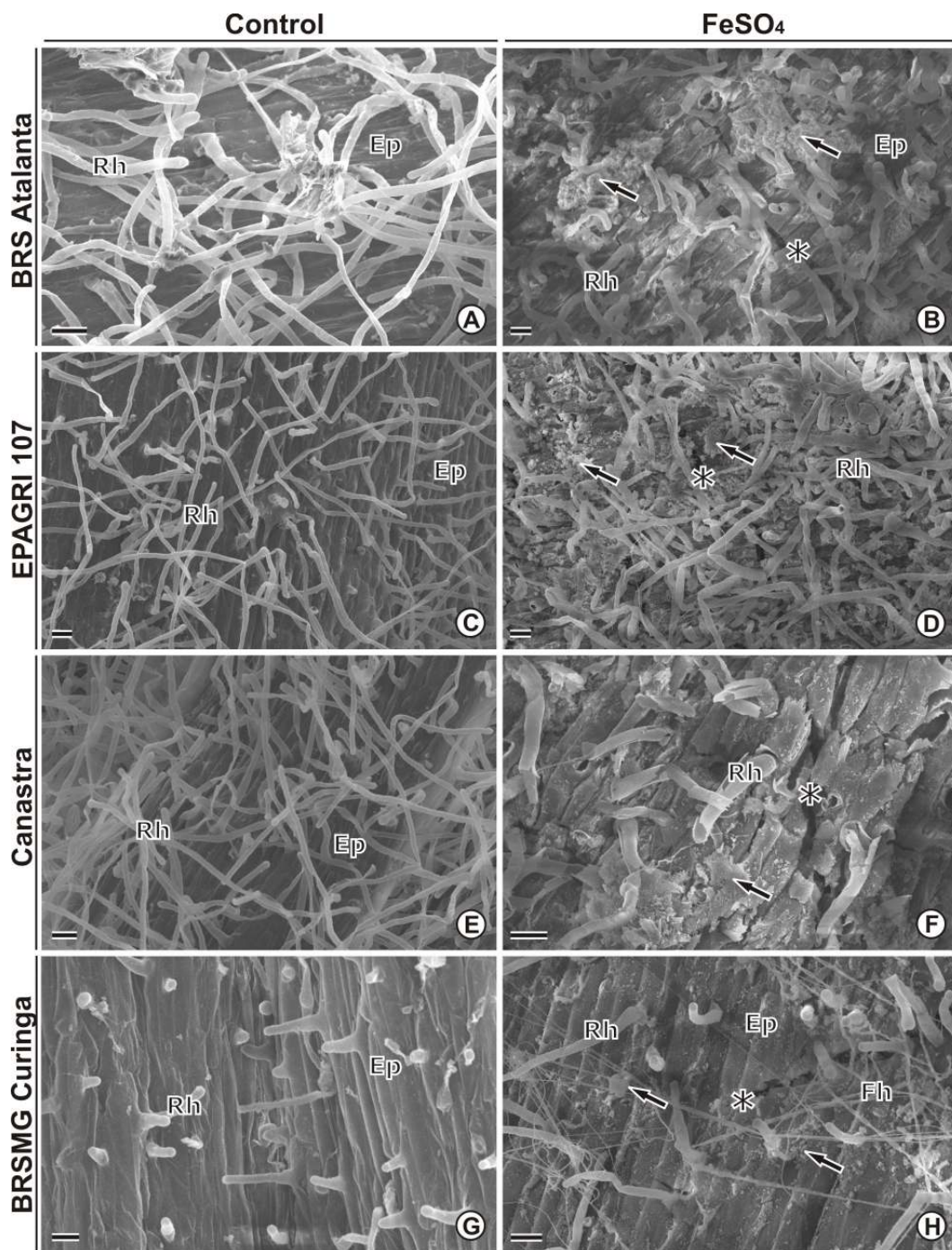


Figure 2: Scanning electron micrographs of rice roots surface. Genotypes: BRS Atalanta (A and B), EPAGRI 107 (C and D), Canastra (E and F) e BRSMG Curinga (G e H). Control treatment (A, C, E and G) e FeSO₄ treatment (B, D, F and H), after 168 h of exposure. A, C, E and G: Root maturation zone without rhizodermal rupture or iron plaque formation. B, D, F and H: Root maturation zone with iron plaque formation and ruptures in the rhizodermis. (Ep) epidermis; (→) iron plaque deposits; (Rh) root hairs; (*) ruptures; (Fh) fungal hyphae. Bars: 20 μm.

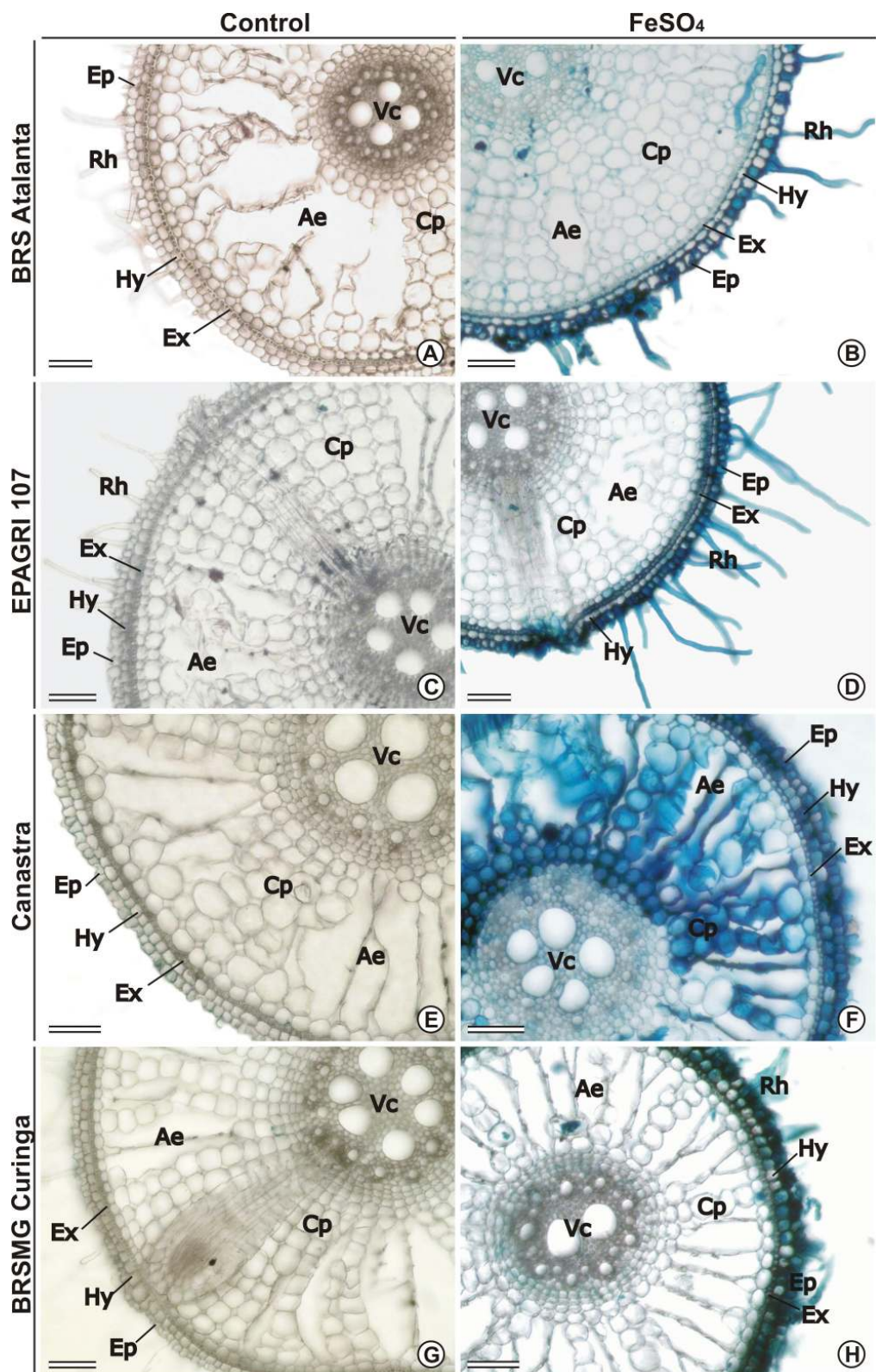


Figure 3: Iron histochemistry in rice roots transversal sections. Genotypes: BRS Atalanta (A and B), EPAGRI 107 (C and D), Canastra (E and F) and BRSMG Curinga (G and H). Control treatment (A, C, E and G). FeSO_4 treatment (B, D, F and H), after 168 h of exposure. (Ep) epidermis, (Ex) exodermis, (Rh) root hairs, (Hy) hypodermis, (Cp) cortical parenchyma, (Ae) aerenchyma, (Vc) vascular cylinder, (Lr) lateral root. Bars: 100 μm .

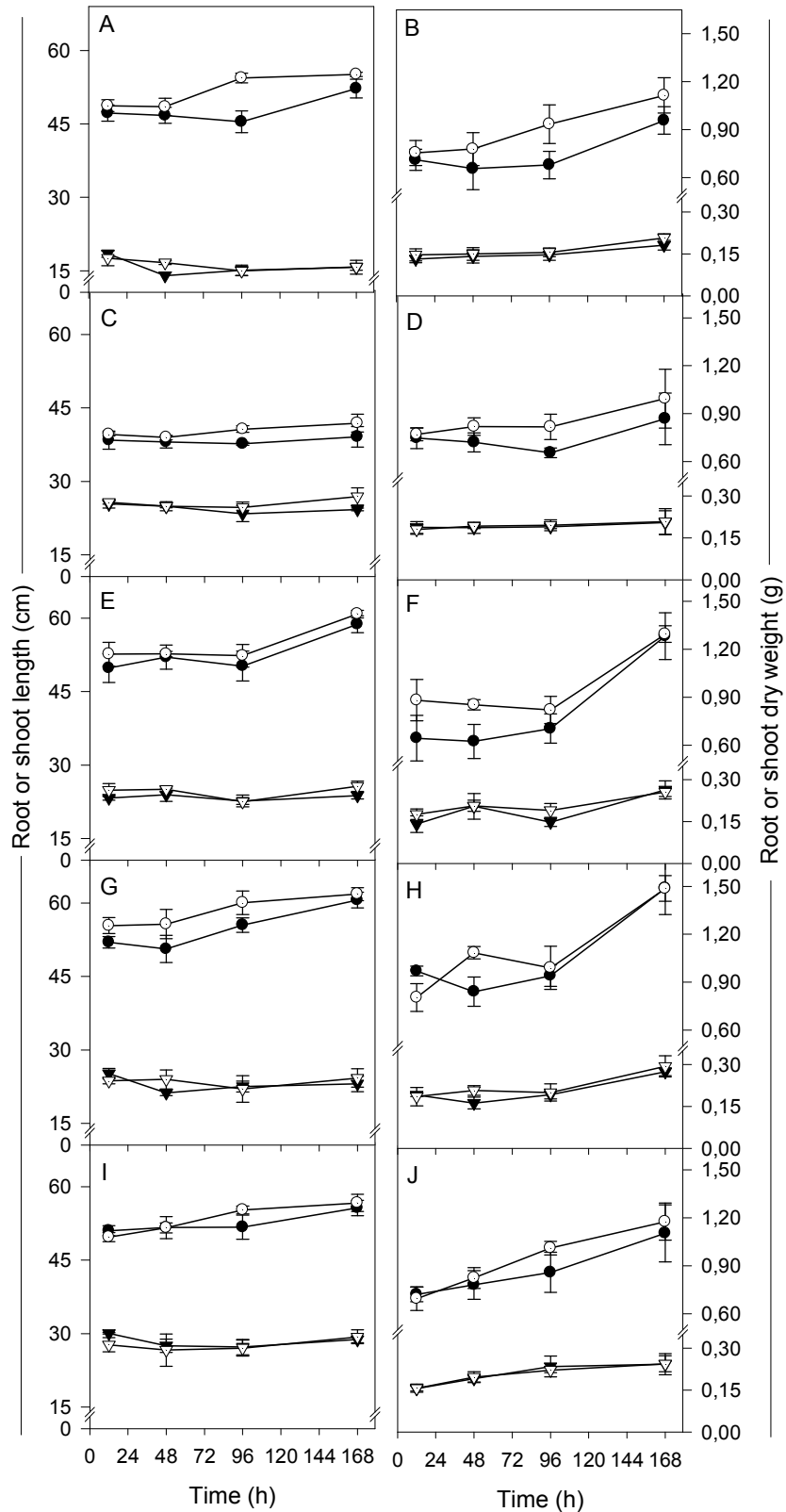


Figure 4: Time effect on length (left panel) and dry weights (right panel) of shoots (circles) and roots (inverted triangles) in iron treated plants (4mM FeSO₄; closed symbols) and control (open symbols) during 168 h. Genotypes: Nipponbare (A and B); Epagri 107 (C and D); BRS Atalanta (E and F); BRSMG Curinga (G and H); Canastra (I and J). Data are means±SE of four replicates.

Fe and others nutrients in iron plaque, uptake and translocation by rice

The Fe amounts in the DCB extracts were increasing along the time of exposition to the FeSO₄ (Fig. 5). The rice genotypes differed in the amount of iron plaque formed. The lowland genotypes accumulate more iron plaque in the root surfaces than upland genotypes (Fig. 5). The genotype Nipponbare was the one with higher iron content in the iron plaque, followed by BRS Atalanta and Epagri 107 (Fig. 5; Tab. 2). The lower Fe content in the iron plaque was observed in the genotype BRSMG Curinga, used in upland and lowland systems. Only the content of P and Fe in the DCB extracts increased due to iron plaque formation on the roots. The content of Mn, Zn and Mg remained unchanged and Cu was not detected in the DCB extracts (Tab. 2).

The Fe content in the roots and shoots of rice genotypes were significantly affected by FeSO₄ supply ($p < 0.001$; Tab. 3). There were no differences between genotypes in the root iron content. However, the genotype Epagri 107 showed the higher shoot iron content after iron plaque formation in the roots (Tab. 3).

In general, iron plaque formation reduced the absorption of phosphorous, magnesium and manganese ($p < 0.001$) and had little effect on zinc ($p < 0.10$) and none effect on copper nutrition (Tab. 3). It was observed a positive correlation between Fe content and P content in DCB extracts ($p < 0.001$). However, the decrease in Mg and Mn absorption due iron plaque formation (Tab. 3; Fig. 6) was not linked with the content of Fe and those nutrients in the iron plaque, has pointed by the non-significant Pearson's correlation coefficient (Fig. 6).

Table 1: Analysis of variance of data depicted in the figure 4. The data were grouped into sub-divided parcels, representing the time of FeSO₄ exposition. Significant level: p<0.05 (*); p<0.01(**); p<0.001(***); n.s. (not significant).

	Shoot		Root	
	length	Dry Weight	length	Dry Weight
Genotypes (G)	***	***	***	***
Treatment (Fe)	**	**	n.s.	n.s.
G × Fe	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Block	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Time (T)	***	***	***	***
G × T	*	*	n.s.	n.s.
Fe × T	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
G × Fe × T	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

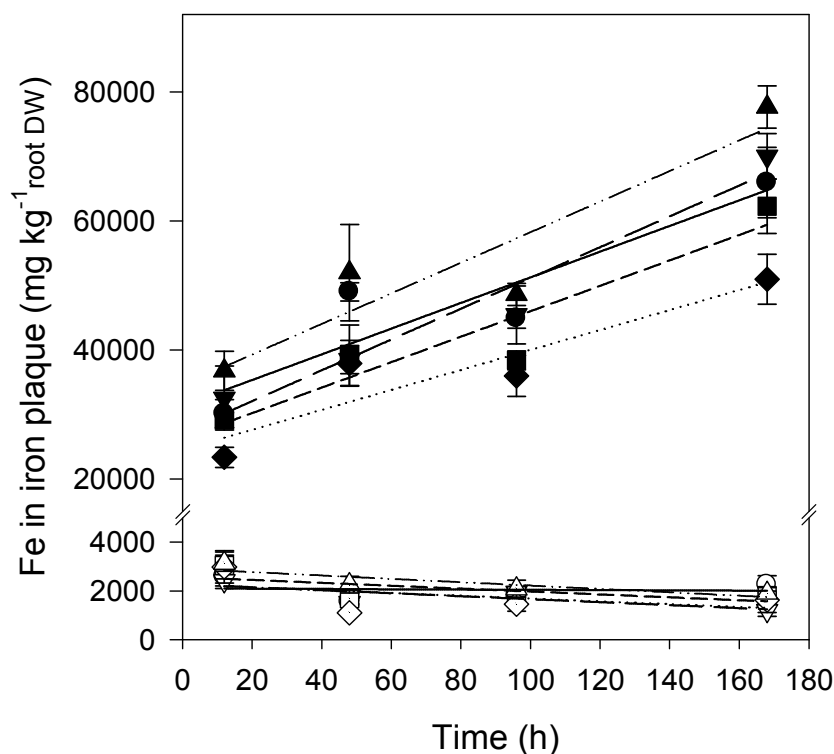


Figure 5: Iron content in iron plaque on root surface of rice plants exposed to 4mM FeSO₄ (closed symbols) and control treatment (open symbols) in nutrient solution during 168 h. Genotypes: Nipponbare (--- and triangles); Epagri 107 (— and circles); BRS Atalanta (--- and inverted triangles); BRSMG Curinga (..... and diamonds); Canastra (----- and squares). Data are means±SE of four replicates fitted against linear regressions (p<0.001 to FeSO₄).

Table 2: Mineral nutrient concentration ($\text{mg kg}^{-1}_{\text{rootDW}}$) in iron plaques of roots of five rice genotypes treated with 4 mM FeSO_4 and control. Data are means \pm SE of four replicates. Mn was not detected in all replicates, so the number of replicates is showed in parenthesis. Copper has not been detected in the DCB extracts.

Genotypes	Treatment	Fe	Mn	Zn	Mg	P
NIPPONBARE	Control	1901 \pm 99 ^{ABb}	24.5 \pm 1.7 ₍₄₎	346.1 \pm 39.3	775.0 \pm 95.7	2094 \pm 318 ^{Ab}
	FeSO_4	77657 \pm 3261 ^{Aa}	24.5 \pm 0.3 ₍₂₎	459.5 \pm 42.7	835.0 \pm 114.7	21885 \pm 786 ^{Aa}
EPAGRI 107	Control	2245 \pm 376 ^{Ab}	14.9 \pm 0.0 ₍₁₎	411.7 \pm 74.9	844.1 \pm 153.2	1443 \pm 189 ^{Ab}
	FeSO_4	65934 \pm 5452 ^{ABa}	20.5 \pm 5.1 ₍₂₎	427.6 \pm 78.6	791.9 \pm 134.1	21688 \pm 1947 ^{Aa}
BRS	Control	1197 \pm 249 ^{Bb}	20.0 \pm 2.0 ₍₃₎	280.0 \pm 34.3	706.3 \pm 29.6	1595 \pm 86 ^{Ab}
ATALANTA	FeSO_4	70018 \pm 3505 ^{Aa}	21.2 \pm 1.1 ₍₄₎	408.6 \pm 39.4	764.4 \pm 63.4	20949 \pm 1420 ^{ABa}
BRSMG	Control	1271 \pm 219 ^{ABb}	21.5 \pm 3.0 ₍₄₎	270.6 \pm 40.2	652.0 \pm 40.8	1602 \pm 108 ^{Ab}
CURINGA	FeSO_4	50978 \pm 3869 ^{Ba}	18.7 \pm 2.3 ₍₂₎	290.4 \pm 22.5	564.6 \pm 34.0	15109 \pm 631 ^{Ba}
CANASTRA	Control	1805 \pm 121 ^{ABb}	25.5 \pm 3.2 ₍₄₎	322.3 \pm 48.0	737.5 \pm 57.5	1794 \pm 228 ^{Ab}
	FeSO_4	62279 \pm 4190 ^{ABa}	15.2 \pm 0.0 ₍₁₎	344.6 \pm 79.3	670.9 \pm 116.4	17786 \pm 1649 ^{ABa}
<i>Analysis of variance</i>						
Genotypes (G)		**	n.s.	n.s.	n.s.	**
Treatment (Fe)		***	n.s.	n.s.	n.s.	***
G \times Fe		**	n.s.	n.s.	n.s.	**
Block		n.s.	n.s.	n.s.	*	n.s.

To Fe and P concentrations means followed by the same letters are not significantly different by Tukey's test at 5% of probability. Capital letters compare genotypes and small letters compare iron treatments. Significant level: $p < 0.05$ (*); $p < 0.01$ (**); $p < 0.001$ (***); n.s. (not significant).

Table 3: Root iron content and shoot mineral nutrient concentration ($\text{mg kg}^{-1}_{\text{DW}}$) in five rice genotypes treated with 4 mM FeSO_4 and control. Data are means \pm SE of four replicates.

Genotypes	Treatment	Root	Shoot					
		Fe	Fe	Mn	Zn	Cu	Mg	P
NIPPONBARE	Control	165 \pm 13	220 \pm 21 ^{Ab}	697 \pm 45	80.0 \pm 7.1	12.3 \pm 0.9	5875 \pm 189	14300 \pm 1484
	FeSO_4	2721 \pm 534	1147 \pm 169 ^{Ba}	410 \pm 50	89.8 \pm 6.7	12.3 \pm 0.9	5100 \pm 235	12250 \pm 1252
EPAGRI 107	Control	173 \pm 40	213 \pm 25 ^{Ab}	760 \pm 36	99.3 \pm 8.7	15.5 \pm 0.6	7450 \pm 126	14875 \pm 519
	FeSO_4	2858 \pm 703	2564 \pm 545 ^{Aa}	345 \pm 35	108.5 \pm 11.7	15.3 \pm 1.1	6575 \pm 304	10125 \pm 736
BRS	Control	149 \pm 12	224 \pm 43 ^{Ab}	712 \pm 34	87.5 \pm 2.5	15.0 \pm 0.4	5750 \pm 166	11975 \pm 75
ATALANTA	FeSO_4	2822 \pm 405	1495 \pm 358 ^{Ba}	396 \pm 25	92.8 \pm 6.3	16.8 \pm 0.5	5300 \pm 158	8700 \pm 505
BRSMG	Control	131 \pm 11	195 \pm 17 ^{Ab}	575 \pm 35	70.0 \pm 5.2	10.0 \pm 0.6	5425 \pm 266	10425 \pm 354
CURINGA	FeSO_4	3062 \pm 627	837 \pm 58 ^{Ba}	292 \pm 23	76.3 \pm 1.9	11.3 \pm 0.5	4775 \pm 281	8275 \pm 403
CANASTRA	Control	171 \pm 16	189 \pm 14 ^{Ab}	622 \pm 30	72.0 \pm 4.1	11.0 \pm 0.4	6275 \pm 48	9850 \pm 150
	FeSO_4	2857 \pm 420	1192 \pm 227 ^{Ba}	317 \pm 18	78.3 \pm 8.2	10.8 \pm 0.8	5800 \pm 319	7075 \pm 541
<i>Analysis of variance</i>								
Genotypes (G)		n.s.	**	***	***	***	***	***
Treatment (Fe)		***	***	***	n.s.	n.s.	***	***
G \times Fe		n.s.	**	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Block		n.s.	n.s.	*	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

To Fe concentrations means followed by the same letters are not significantly different by Tukey's test at 5% of probability. Capital letters compare genotypes and small letters compare iron treatments. Significant level: $p < 0.05$ (*); $p < 0.01$ (**); $p < 0.001$ (***); n.s. (not significant).

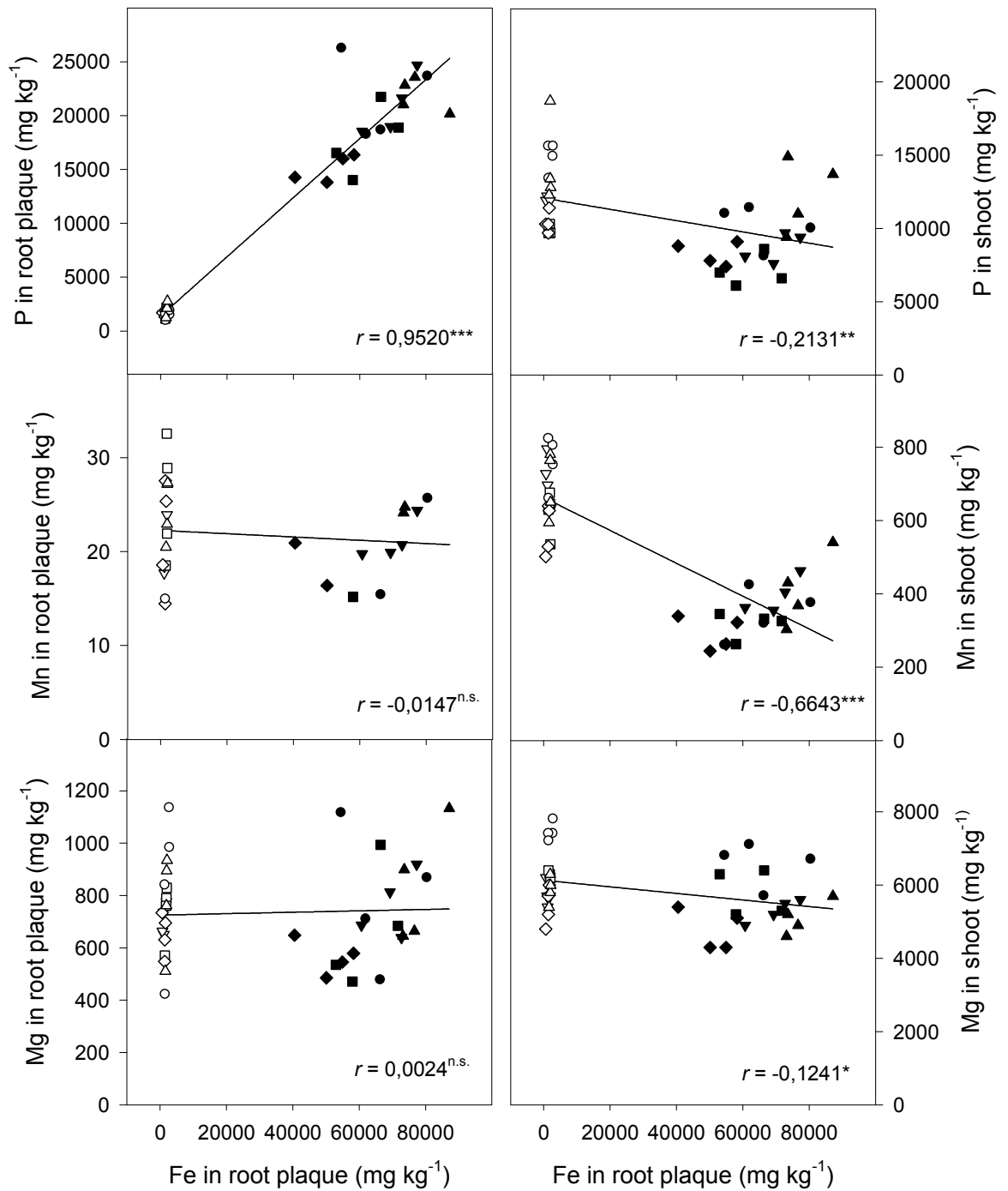


Figure 6: Correlation among iron and other nutrients content in root plaque (right panel) and in shoots (right panel) of five rice genotypes exposed to 4mM FeSO₄ (closed symbols) or control treatment (open symbols) in nutrient solution. Genotypes: Nipponbare (triangles); Epagri 107 (circles); BRS Atalanta (inverted triangles); BRSMG Curinga (diamonds); Canastra (squares). r = Pearson's correlation coefficient. Significant level: $p < 0.05$ (*); $p < 0.01$ (**); $p < 0.001$ (***) ; n.s. (not significant).

Chlorophyll a fluorescence

The 4mM FeSO₄ treatment did not caused significant changes in the chlorophyll *a* fluorescence parameters in rice plants (Tab. 4 and Fig. 7).

Excluding F₀, the rice genotypes differed widely in all chlorophyll *a* fluorescence parameters evaluated (p<0.001; Tab. 4). The upland genotypes showed the highest values of apparent electron transport rate through PSII (ETR), non-photochemical (NPQ) and photochemical (q_p) quenching and maximal PSII quantum yield (F_v/F_m). Even in the genotypes with lower F_v/F_m values, it did not decrease below 0.8 (Fig. 7).

The chlorophyll *a* fluorescence parameters showed significant differences along the leaf surface (Tab. 4). In general the central region of the leaf showed the highest values of F_v/F_m, q_p and ETR (Fig. 7).

Table 4: Analysis of variance of data depicted in the figure 7. Effect of iron plaque formation on chlorophyll *a* fluorescence parameters. The data were grouped into subdivided parcels representing the area of interest (AOI) over the leaf surface: center, right and left side. Significant level: p<0.05 (*); p<0.01(**); p<0.001(***); n.s. (not significant).

	F ₀	F _v /F _m	q _p	NPQ	ETR
Genotypes (G)	n.s.	**	***	***	***
Treatment (Fe)	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
C × Fe	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Block	*	*	n.s.	***	*
AOI	***	**	***	n.s.	***
G × AOI	**	n.s.	*	n.s.	n.s.
Fe × AOI	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
G × Fe × AOI	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

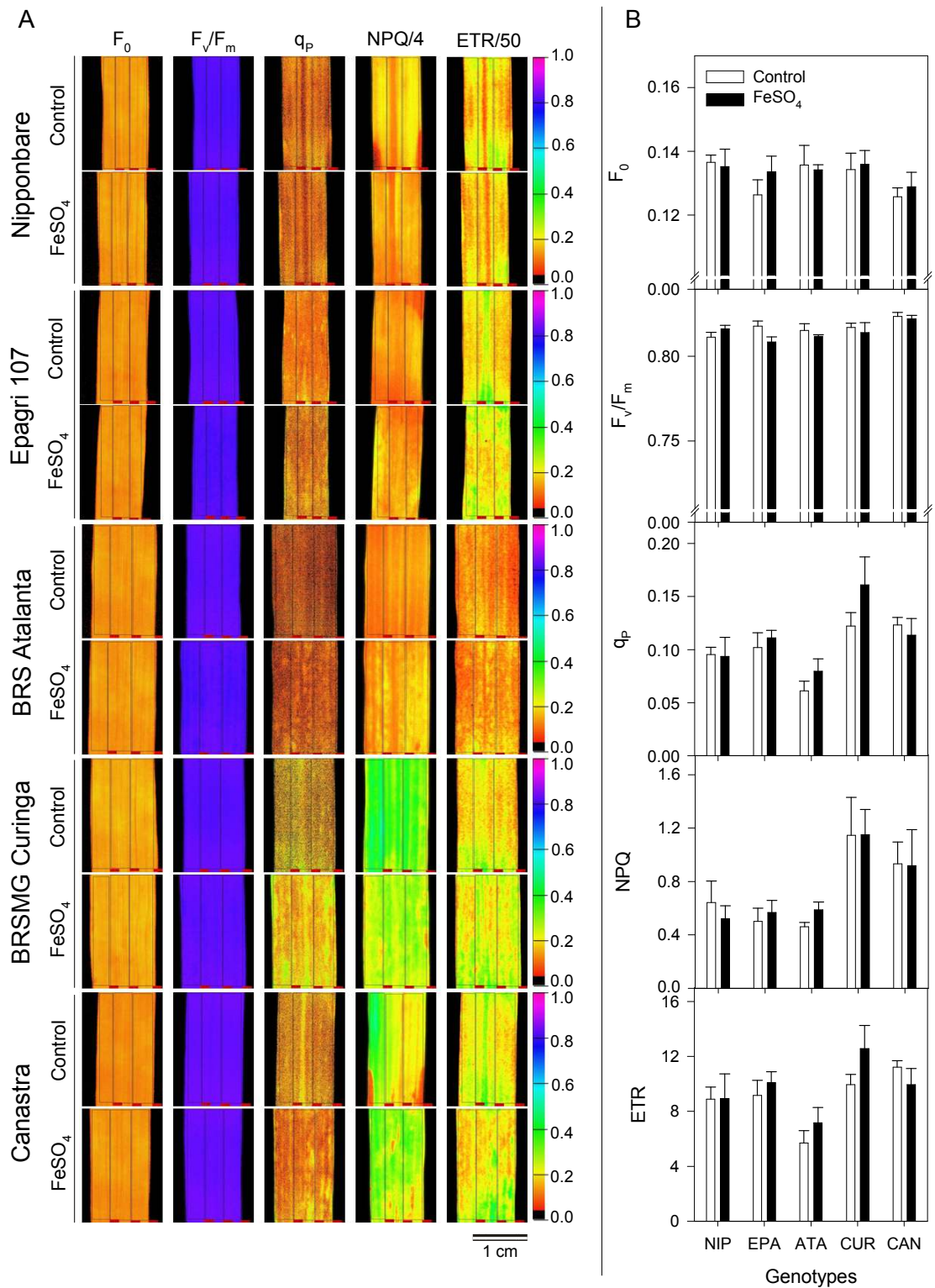


Figure 7: Chlorophyll a fluorescence images (A) and graphic representations (B) of minimal fluorescence (F_0), maximal PSII quantum yield (F_v/F_m), photochemical (q_p) and non-photochemical quenching (NPQ), and electron transport rate through PSII (ETR) of five rice genotypes exposed to 4 mM of $FeSO_4$ (closed columns) or control treatment (open columns) in nutrient solution. Genotypes: Nipponbare (NIP); Epagri 107 (EPA); BRS Atalanta (ATA); BRSMG Curinga (CUR); Canastra (CAN). Data are mean \pm SE of four replicates.

Discussion

In waterlogged soils iron plaque is commonly found in various plant species (Taylor *et al.*, 1984; Snowden and Wheeler, 1995; Chabbi, 1999; Batty *et al.*, 2000; Hansel *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2004; Møller and Sand-Jensen, 2008). As well as in rice, the thickness of the iron plaque in wetland plants may increase with the time of exposure to iron (Snowden and Wheeler, 1995). In the present study, the iron plaque formed unevenly over the root surface (Fig. 1 and 2). The redox potential vary temporally and spatially in the rhizosphere of rice seedlings (Bravin *et al.*, 2008), leading to changes in iron plaque in the rhizosphere. The amount of iron plaque on the roots may vary according to different oxidation capacity in the root regions (Liu *et al.*, 2006; Møller and Sand-Jensen, 2008).

The results obtained with scanning electron microscopy (SEM) in this study is in accordance to a model of iron plaque formation proposed by Chen *et al.* (1980a). In this model, the cell wall provides a template for the development of polyhedral iron oxide deposits through the precipitation of FeOOH on both the internal and external surfaces of the cell wall (Fig. 2 and 3). Subsequently, the outer cell walls may decompose, allowing a junction of deposits to form over a large portion of the root surface, completely masking the limit of the cells (Fig. 2).

Roots of all genotypes growing under iron excess showed transverse ruptures (Fig. 2). These ruptures apparently were formed not by separation of intact cells, but by breaking and tearing individual cells of rhizodermis and outer cortex from the underlying tissues. Similar results were also found in roots exposed to others metals such as Al, Cu and La (Sheldon and Menzies, 2005; Kopittke *et al.*, 2008, 2009).

The root endodermis and exodermis are the two “physiological sheaths” that play important roles in basic root function and protection against stresses in plants (Enstone *et al.*, 2003). Thus, the root contributes to the control of the movement of iron and others elements towards the plant. Both layers are present in lowland and in upland rice genotypes (Miyamoto *et al.*, 2001). The root exodermis probably prevented the deposit of iron in the cortex of the lowland genotypes and the genotype BRSMG Curinga. However, for the upland genotype Canastra the iron was deposited all over the cortex and endodermis (Fig. 3). The rhizodermis, exodermis and endodermis cells therefore regulate the traffic of iron and contributing to avoid its excessive loading into shoot tissues. Histochemistry localization of iron indicates the presence of strategy I

iron transporter protein OsIRT1, at epidermis and exodermis, especially in the lateral roots (Ishimaru *et al.*, 2006).

The suberization and lignification of root exodermis represent an adaptation that effectively limits the oxygen diffusion out of the aerenchyma in lowland genotypes (Colmer *et al.*, 1998; Armstrong *et al.*, 2000), leading to a low capacity of rice to take up water (Hose *et al.*, 2001). The upland genotype Canastra apparently optimize radial transport of water, lowering the effectiveness of exodermis. So, it falls to endodermis to prevent the apoplastic passage of ions from the cortex. The plasticity in root physiology (Fig. 3) and the plasticity to cope with light in excess (Fig. 7) of the genotype BRSMG Curinga, presumably contributes to its ability to grow in diverse environments that differ markedly in soil waterlogging, such as drained upland soils as well as waterlogged paddy fields.

The differences among genotypes in the formation and the amounts of iron plaque (Fig. 5) could reflect genotypic difference in the oxidation capacity of roots during the growth period (Liu *et al.*, 2006). The genotype Nipponbare showed higher iron plaque formation over the root surface in all evaluations (Fig. 5) and also showed lower length and dry weight of roots (Fig. 4).

The highest leaf iron content was found in Epagri 107, a genotype frequently pointed out as iron-tolerant. Among all genotypes, the iron plaque formation started earliest in Epagri 107. The lowland genotypes showed higher root oxidation capacity, certificated by iron plaque formation on roots (Fig. 5).

Formation of iron plaque in roots is generally considered to be a mechanism that aquatic plants have evolved to inhibit excessive Fe uptake and acclimate to anaerobic conditions (Liu *et al.*, 2008). However, high Fe concentration in the substrate can potentially lead to iron toxicity in these plants and consequently reduce plant growth (Batty and Younger, 2003). In spite of the root act as the location of iron absorption, the shoot growth showed higher sensitivity to the iron treatments (Fig. 4; Tab. 3).

Iron toxicity is related to multiple nutritional stresses (Dobermann and Fairhurst, 2000). Most of published studies on rice have focused on the role of iron plaque in the uptake of one single element. In the present study iron plaque caused significant reductions ($p < 0.001$) in the shoot content of phosphorous, manganese and magnesium (Tab. 2). However, above the critical limit for deficiency in rice (Dobermann and Fairhurst, 2000).

Probably, changes in leaf nutrient status may be due to different causes. The decrease in shoot P concentration may be related to the interactions of this element with iron plaque (Fig. 6A). Iron oxides are generally considered to have great adsorption capacity of inorganic anions, especially phosphate. Iron plaque, therefore, may have immobilized P at the root surface, reducing its assimilation (Christensen and Wigand, 1998, Zhang *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2004). Iron plaque increasing P-deficiency in aquatic plant has been previously demonstrated in *Lobelia dortmanna* (Christensen and Wigand, 1998). The reduction in Mn and Mg content in rice shoots (Tab. 2), seems to be unrelated to sequestration of these nutrients by iron plaque (Fig. 6C and 6E) as in the case of P (Fig. 6A). Increased Fe absorption may reduce Mn uptake by rice plants (Dobermann and Fairhurst, 2000) competing to sensitive metabolic sites, such as common metal transporters and chelators (Portnoy *et al.*, 2002, Varoto *et al.*, 2002). Moreover, as showed in the present study, iron plaque may have a limited capacity to adsorb metals such as Mn, Cu (Batty *et al.*, 2000) and Mg.

Copper was not detected in DCB extracts of rice roots of all genotypes, so iron plaque was not an efficient external mechanism of Cu immobilization in the plants (St-Cyr and Crowder, 1989). Ye *et al.* (1997) found significantly high Cu concentration on root surfaces of *Typha latifolia* seedlings with iron plaque. The Cu concentrations in shoots and in roots were similar in seedlings with or without plaque. Otte *et al.* (1989) and Zhang *et al.* (1998) found that Zn content in rice plants increased and then decreased with increased amount of iron plaque on the root surface and there was a positive correlation with Zn concentration in DCB extracts. Moreover, root-induced acidification resulting from Fe^{2+} oxidation and the release of H^+ from the roots may reduce the mobility of cations in the rhizosphere and hence their movement to roots (Neue *et al.*, 2007).

Plant nutritional disorders triggered by iron plaque formation on roots are a complex feature. Iron plaque can accumulate ions from the growth medium, interfere with metal absorption by roots and affect the whole process of nutrient uptake by plants. The transport of nutrient elements from soil to iron plaque and then to rice shoots may depend on the intrinsic characteristics of rice genotypes, composition and amount of the plaque and duration of the exposure period. The differences of iron plaque formation among the genotypes from upland and lowland systems may be an indicative of differences in exodermis selectivity, root oxidative capacity and iron nutrition

mechanisms. These indicative of genotypic differences in iron metabolism can be used for increasing rice productivity on iron toxic soils.

Acknowledgements

We thanks to Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) and Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG) for providing us with rice seeds. This investigation was supported by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (PROCAD/CAPES grant number 0361054/2005) and Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG grant number APQ-1011-3.08/07), Brazil.

References

- Adigbo SO, Okeleye KA, Adigbo VB.** 2007. Performance of upland rice fitted into lowland rice–vegetable/cowpea sequence in rainfed Inland valley. *Agronomy journal* **90**, 377–383.
- Armstrong W, Cousins D, Armstrong J, Turner DW, Beckett PM.** 2000. Oxygen distribution in wetland plant roots and permeability barriers to gas-exchange with the rhizosphere: a microelectrode and modelling study with *Phragmites australis*. *Annals of Botany* **86**, 687–703.
- Batty LC, Baker AJM, Wheeler BD, Curtis CD.** 2000. The effect of pH and plaque on the uptake of Cu and Mn in *Phragmites australis* (Cav.) Trin ex. Steudel. *Annals of Botany* **86**, 647–53.
- Batty LC, Younger PL.** 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**, 801–6.
- Bienfait HF, Van Den Briel ML, Mesland-Mul NT.** 1984. Measurement of the extracellular mobilizable iron pool in roots. *Journal of Plant Nutrition* **7**, 658–665.
- 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.
- Bravin M, Travassac F, Le Floch M, Hinsinger P, Garnier JM.** 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.
- Chabbi A.** 2003. Metal concentrations in pore water of the Lusatian lignite mining sediments and internal metal distribution in *Juncus bulbosus*. *Water Air Soil Pollution* **3**:105–17.
- Chen CC; Dixon JB, Turner FT** 1980a. Iron coatings on rice roots: morphology and models of development. *Soil Science Society of America*, **44**, 1113–1119.

- Chen CC; Dixon JB, Turner FT** 1980b. Iron coatings on roots: mineralogy and quantity influencing factors. *Soil Science Society of America*, **44**: 635–639.
- Chen RF, Shen RF, Gu P, Dong XY, Du CW, Ma JF.** 2006. Response of rice (*Oryza sativa*) with root surface iron plaque under aluminium stress. *Annals of Botany* **98**, 389–95.
- Christensen KK, Wigand C.** 1998. Formation of root plaques and their influence on tissue phosphorus content in *Lobelia dortmanna*. *Aquatic Botany* **61**, 111–122.
- Colmer TD, Gibberd MR, Wiengweera A, Tinh TK.** 1998. The barrier to radial oxygen loss from roots of rice (*Oryza sativa* L.) is induced by growth in stagnant solution. *Journal of Experimental Botany* **49**, 1431–1436.
- Conlin TSS, Crowder AA.** 1989. Location of radial oxygen loss and zones of potential iron uptake in a grass and two non-grass emergent species. *Canadian Journal of Botany* **67**, 717–722.
- Counce PA, Keisling TC, Mitchell A.J** 2000. A uniform, objective and adaptive system for expressing rice development. *Crop Science* **40**, 436–443.
- Dobermann A, Fairhurst T.** 2000. *Rice: Nutrient Disorders & Nutrient Management*. Potash and Phosphate Institute, Potash and Phosphate Institute of Canada, and International Rice Research Institute, Singapore. 191pp.
- Enstone DE, Peterson CA, Ma F.** 2003. Root endodermis and exodermis: Structure, function, and responses to the environment. *Journal of Plant Growth Regulation* **21**, 335–351.
- Fageria NK, Rabelo NA.** 1987. Tolerance of rice cultivars to iron toxicity. *Journal of Plant Nutrition* **10**, 653–661.
- Greipsson S, Crowder AA.**1992. Amelioration of copper and nickel toxicity by iron plaque on roots of rice (*Oryza sativa*). *Canadian Journal of Botany* **70**, 824–30.
- Greipsson S.** 1995. Effect of iron plaque on roots of rice on growth of plants in excess zinc and accumulation of phosphorus in plants in excess copper or nickel. *Journal of Plant Nutrition* **18**, 1659–65.
- Hansel CM, Fendorf S, Sutton S, Newville M** 2001. Characterization of Fe plaque and associated metals on the roots of mine-waste impact aquatic plants. *Environmental Science and Technology* **35**, 3863–3868.
- Hoagland DR, Arnon DI.** 1938. *The method for growing plants without soil: water-culture*. Berkeley: Univ. of California, 32pp. Circular of the Agricultural Experimentation Station.
- Hose E, Clarkson DT, Steudle E, Schreiber L, Hartung W.** 2001. The exodermis – a variable apoplastic barrier. *Journal of Experimental Botany* **52**, 2245–2264.
- Howeler RH** (1973) Iron- induced orange disease of rice in relation to physico-chemical changes in flooded oxisol. *Soil Science Society of American Proceedment*, **37**: 898–903.
- Ishimaru Y, Suzuki M, Tsukamoto T, Suzuki K, Nakazono M, Kobayashi T, Wada Y, Watanabe S, Matsuhashi S, Takahash M, Nakanishi H, Mori S, Nishizawa NK.** 2006. Rice plants take up iron as an Fe³⁺-phytosiderophore and as Fe²⁺. *The Plant Journal* **45**, 335–346.

- Kampfenkel K, Montagu MV, Inzé D.** 1995. Effects of Iron Excess on *Nicotiana plumbagnifolia* Plants: Implications to Oxidative Stress. *Plant Physiology* **107**, 725–735.
- Karnovsky MJ.** 1965. A formaldehyde – glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *Journal of Cellular Biology* **27**, 27–137.
- Kitajima M, Buter WL.** 1975. Quenching of chlorophyll fluorescence and primary photochemistry in chloroplasts by dibromothymoquinone. *Biochimica et Biophysica Acta* **376**, 105–115.
- Kopittke PM, Asher CJ, Blamey FPC, Menzies NW.** 2009. Toxic effects of Cu⁺² on growth, nutrition, root morphology, and distribution of Cu in roots of Sabi grass. *Science of the Total Environment* **407**, 4616–4621.
- Kopittke PM, Blamey FPC, Menzies NW.** 2008. Toxicities of soluble Al, Cu, and La include ruptures to rhizodermal and root cortical cells of cowpea. *Plant and Soil* **303**, 217–227.
- Liu H, Zhang J, Christiec 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 WJ, Zhu YG, Hu Y, Williams PN, Gault AG, Meharg AA, Charnock JM, Smith FA.** 2006. Arsenic sequestration in iron plaque, its accumulation and speciation in mature rice plants (*Oryza sativa* L.), *Environmental Science and Technology* **40**, 5730–5736.
- Liu WJ, Zhu Yg, Smith Fa, Smith Se.** 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.
- 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 of Histology and Cytology*, **70**, 1–19.
- Melis A, Spangfort M, Andersson B.** 1987. Light-absorption and electron-transport balance between photosystem II and photosystem I in spinach chloroplasts. *Photochemistry and Photobiology* **45**, 129–136.
- Miyamoto N, Steudle E, Hirasawa T, Lafitte R.** 2001. Hydraulic conductivity of rice roots. *Journal of Experimental Botany* **52**, 1835–1846.
- Møller CL, Sand-Jensen K.** 2008. Iron plaques improve the oxygen supply to root meristems of the freshwater plant, *Lobelia dortmanna*. *New Phytologist* **179**, 848–856.
- Neue HU, Quijano C, Senadhira D, Setter T.** 1998. Strategies for dealing with micronutrient disorders and salinity in lowland rice systems. *Field Crops Resesarch* **56**, 139–156.
- Otte ML, Rozema J, Koster L, Haarsma MS, Broekman RA.** 1989. Iron plaque on roots of *Aster tripolium* L.: Interaction with zinc uptake. *New Phytologist* **111**, 309–317.
- Oxborough K, Baker NR.** 1997. Resolving chlorophyll *a* fluorescence images of photosynthetic efficiency into photochemical and non-photochemical components – calculation of q_p and F_v'/F_m' without measuring F_0' . *Photosynthesis Research* **54**, 135–142.

- Portnoy ME, Jensen LT, Culotta VC.** 2002. The distinct methods by which manganese and iron regulate the Nramp transporters in yeast. *Biochemical Journal* **362**, 119–124.
- Sheldon AR, Menzies NW.** 2005. The effect of copper toxicity on the growth and root morphology of Rhodes grass (*Chloris gayana* Knuth.) in resin buffered solution culture. *Plant and Soil* **278**, 341–349.
- Snowden RED, Wheeler BD.** 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.
- Soares AA, Cornélio VMO, Reis MS, Soares PC, Santos PG, Sousa MA.** 2005. 'BRSMG CURINGA': Cultivar de arroz para plantio em terras altas e várzeas. *Revista Ceres [Brasil]* **52**, 967–974.
- St-Cyr L, Crowder AA.** 1989. Factors affecting iron plaque on the roots of *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steudel. *Plant and Soil* **116**, 85–93.
- Taylor GJ, Crowder AA, Rodden R** 1984. Formation and morphology of an iron plaque on the roots of *Typha latifolia* L. grown in solution culture. *American Journal of Botany*, 71: 666–675.
- Taylor GJ, Crowder AA.** 1983. Use of the DCB technique for extraction of hydrous iron oxides from roots of wetland plants. *American Journal of Botany* **70**, 1254–1257
- Varotto C, Maiwald D, Pesaresi P, Jahns P, Salamini F, Leister D.** 2002. The metal ion transporter IRT1 is necessary for iron homeostasis and efficient photosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **31**, 589–599.
- Ye ZH, Baker AJM, Wong MH, Willis AJ.** 1997. Copper and nickel uptake, accumulation and tolerance in *Typha latifolia* with and without iron plaque on the root surface. *New Phytologist* **136**, 481–488.
- Ye ZH, Baker AJM, Wong MH, Willis AJ.** 1998. Zinc, lead and cadmium accumulation and tolerance in *Typha latifolia* as affected by iron plaque on the root surface. *Aquatic Botany* **61**, 55–67.
- Zhang XK, Zhang FS, Mao DR.** 1998. Effect of iron plaque outside roots on nutrient uptake by rice (*Oryza sativa* L.): zinc uptake by Fe-deficient rice. *Plant and Soil* **202**, 33–39.
- Zhang XK, Zhang FS, Mao DR.** 1999. Effect of iron plaque outside roots on nutrient uptake by rice (*Oryza sativa* L.): phosphorus uptake. *Plant and Soil* **209**, 187–192.

CAPÍTULO 3

Alterações fotossintéticas em resposta ao excesso de ferro e dióxido de enxofre em plantas de restinga

Resumo O litoral Brasileiro abriga várias indústrias do setor minerador que diariamente lançam no ecossistema de restinga níveis consideráveis de SO₂ e minério de ferro. Esses poluentes depositam-se sobre a vegetação na forma de precipitações ácidas e de material sólido particulado de ferro (MSP_{Fe}), afetando o crescimento e a sobrevivência de espécies sensíveis e resultando em alterações significativas na biodiversidade das comunidades vegetais. O objetivo do trabalho foi avaliar a resposta de duas espécies de restinga: *Clusia spiritu-sanctensis* e *Aspidosperma parvifolium*, submetidas, em condições de campo e em casa de vegetação, à aplicação de material sólido particulado de ferro (MSP_{Fe}) e SO₂. Plantas jovens das duas espécies foram inseridas em área de restinga adjacente a fonte poluidora. Ao longo de 15 meses, totalizando 6 datas amostrais, foram avaliados diversos parâmetros fisiológicos. Em casa de vegetação as plantas foram submetidas à aplicação diária de 6 mg cm⁻² de MSP_{Fe} aplicado sobre a superfície dos vasos; à neblina ácida simulada (pH 3,0); ou à combinação de ambos os fatores. As plantas expostas aos poluentes apresentaram acúmulo significativo de ferro nos tecidos. Os maiores teores desse elemento foram observados em *A. parvifolium* que também apresentou incremento nos teores de enxofre sob condições de campo. Após a terceira aplicação de neblina ácida simulada, foi detectada aparecimento das primeiras necroses em *A. parvifolium* enquanto as necroses em *C. spiritu-sanctensis* somente apareceram após um mês de aplicação. Houve redução na fotossíntese em ambas as espécies nas duas condições de exposição aos poluentes (em campo ou casa de vegetação). Os parâmetros de trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a* apresentaram alterações mais drásticas em resposta aos tratamentos com aplicação de neblina ácida simulada. Foram observadas reduções no rendimento quântico efetivo do fotossistema II (ϕ_{II}), *quenching* fotoquímico e taxa aparente de transporte de elétrons. Sob condições de campo o parâmetro de fluorescência mais sensível foi o ϕ_{II} . Nas duas espécies a precipitação ácida causou erosão da cera epicuticular, deformação nos estômatos e perfurações principalmente na epiderme da

lâmina foliar de *A. parvifolium*. Somente nessa espécie foi observada lixiviação de nutrientes minerais das folhas submetidas à neblina ácida e também modificação da permeabilidade seletiva das membranas nas plantas sob condições de campo. A introdução de novos fatores ambientais, potencialmente deletérios como SO₂ e MSP_{Fe} pode contribuir para a redução do desempenho fotossintético em espécies sensíveis, culminando na alteração da fitofisionomia da restinga, principalmente ao afetar espécies centrais na dinâmica das comunidades vegetais.

Palavras-chave: *Aspidosperma parvifolium*, *Clusia spiritus-sanctensis*, material particulado, precipitação ácida.

Changes in photosynthesis due to iron excess and sulphur dioxide in restinga plant species

Abstract The Brazilian coastline hosts many mining factories that daily launch in the restinga ecosystem considerable amounts of SO₂ and iron ore. These pollutants are deposited on vegetation as acid precipitations and as iron solid particulate matter (SPM_{Fe}), affecting the growth and the survival of sensitive species and resulting in significant changes in plant community biodiversity. The purpose of this study was evaluating the responses of two restinga plant species: *Clusia spiritu-sanctensis* e *Aspidosperma parvifolium*, to the application of SPM_{Fe} and SO₂ under field and greenhouse conditions. Young plants were introduced in area of restinga near to a pollution source. Along 15 months of exposure, totalizing 6 dates of sampling, several physiological parameters were evaluated. In greenhouse the plants were submitted to the daily application of 6 mg SPM_{Fe} cm⁻² applied over the soil surface; to the simulated acid mist (pH 3.0); or to the combination of both factors (acid mist plus SPM_{Fe}). The plant exposure to the pollutants leads to significant iron increase into tissues. The higher Fe content was found in *A. parvifolium* which also presented increased sulphur content under field exposure. After the third simulated acid mist application was detected the first necrosis in *A. parvifolium*. The necrosis in *C. spiritu-sanctensis* were noticed only one month later. There was decrease in photosynthesis in both species under all exposition conditions (field and greenhouse). The gas exchange and chlorophyll *a* parameters were more drastically affected in response to the treatments with simulated acid mist. Reductions in effective quantum yield of photosystem II (ϕ_{II}), photochemical quenching and apparent electron transport rate were observed. Under field conditions the parameter ϕ_{II} was the most sensitive among other chlorophyll *a* fluorescence parameters. In both species acidic precipitation caused epicuticular wax erosion, stomatal deformations and perforations of epidermis in *A. parvifolium*. Only in *A. parvifolium* it was observed leaching of leaf nutrient in plants exposed to simulated acid mist and impairment of membrane permeability in field expose plants. The introduction of new anthropic factors potentially deleterious such as SO₂ and SPM_{Fe} may lead to diminished photosynthetic performance in sensitive species, specially when central species in plant community dynamic were affected.

Key-words: *Aspidosperma parvifolium*, *Clusia spiritu-sanctensis*, particulate matter, acid precipitation.

Introdução

Diversos setores industriais lançam continuamente poluentes atmosféricos na forma de nano e macro-partículas sobre a vegetação. Dentre as potenciais fontes emissoras encontram-se indústrias de mineração, de extração de calcário, cimento, pedreiras e carvoarias. Os efeitos desses poluentes dependem de seus constituintes químicos, tamanho e distribuição, bem como da vegetação atingida (Grantz *et al.*, 2003). Tais indústrias estão normalmente localizadas em regiões com vegetação nativa de cerrado, mata atlântica ou restinga.

Ecossistemas costeiros, como a restinga, que outrora ocupavam grande extensão do litoral brasileiro, hoje se encontram fortemente alterados devido à ação humana. O número de usinas do setor de mineração e beneficiamento de minério de ferro (Fe) cresce de forma acelerada. O Brasil é um dos grandes produtores e exportadores mundiais de minério de ferro (Austin *et al.*, 2007) e atualmente busca a liderança do mercado mundial. O litoral do Espírito Santo abriga várias destas indústrias do setor minerador que diariamente lançam no ecossistema de restinga quantidades consideráveis de dióxido de enxofre (SO₂) e pó de ferro (MSP_{Fe}), atingindo uma média geométrica mensal de partículas totais em suspensão (PTS) acima de 75 µg m⁻³ (Lopes *et al.*, 2000) quando o permitido pelo CONAMA é 60 µg m⁻³ de PTS (CONAMA, 1990). Tais poluentes podem significativamente comprometer a sobrevivência de espécies sensíveis na restinga (Silva *et al.*, 2005, 2006; Kuki *et al.*, 2008a b).

O MSP_{Fe} afeta as plantas tanto por mecanismos físicos, ao perturbar o balanço de radiação, ao causar abrasão e aquecimento foliar e ao danificar o controle estomático; como por mecanismos químicos ao provocar a lixiviação de nutrientes das folhas e ao afetar o pH, o estado nutricional e a microflora do solo (Grantz *et al.*, 2003; Pereira *et al.*, 2009).

O SO₂ na atmosfera reage com o hidrogênio formando ácido sulfúrico, o principal componente da chuva ácida nessa região. Essa reação ocorre em densas nuvens de poluição onde se encontram o ferro, outros metais e gases formados no processo industrial (Kelly e Strickland, 1986; Lee *et al.*, 2006).

Os efeitos das precipitações ácidas sobre a fisiologia das plantas, dentre outros fatores, é devido, provavelmente, ao excessivo acúmulo intracelular de H⁺ e outros íons,

o que leva à mudanças da permeabilidade das membranas, aumento da acidez no estroma dos cloroplastos, desacoplamento no transporte de elétrons e conseqüente redução nos níveis de ATP e NADPH (Velikova *et al.*, 1999). O ferro torna-se prontamente disponível para as plantas em baixos valores de pH (Hell e Stephan, 2003). Dessa forma, o incremento na disponibilidade do ferro determinado pela redução da acidez do solo pela chuva ácida, pode resultar no acúmulo excessivo desse metal nos tecidos vegetais potencializando a formação de espécies reativas de oxigênio e estresse oxidativo (Becana *et al.*, 1998). Os efeitos da chuva ácida e da deposição de pó de minério de ferro sobre a vegetação são muito mais prejudiciais quando combinados do que se tomados separadamente (Neves *et al.*, 2009), uma vez que o efeito de um pode ser potencializado pela ação do outro, levando à vegetação da restinga uma nova e antrópica situação de estresse.

A capacidade de determinada espécie vegetal tolerar nova situação de estresse dependerá de sua resposta fisiológica às variações do ambiente, sendo a fotossíntese uma das principais funções afetadas. Inseridas na comunidade vegetal da restinga encontram-se espécies que apresentam diferentes metabolismos fotossintéticos. Além do típico modelo “C3”, outros mecanismos envolvem a fixação do CO₂ atmosférico. Plantas que apresentam o metabolismo ácido das crassuláceas (CAM) são especialmente equipadas para manutenção satisfatória da fotossíntese com mínima perda de água pelos estômatos (Lüttge, 2004). Esta e outras características fisiológicas e morfológicas permitem que plantas CAM tolerem grande variedade de estresses abióticos (Black e Osmond, 2003).

Estudos recentes relacionados à resposta fisiológica de *Clusia hilariana* Schlechtendal, importante espécie CAM de restinga, sob deposição de MSP_{Fe}, indicam sua considerável tolerância a altos níveis de ferro no solo (Pereira, 2006; Pereira *et al.*, 2009). Essa espécie, entretanto, apresentou graves injúrias quando o MSP_{Fe} foi depositado sobre suas superfícies fotossintetizantes.

Clusia é o único gênero com metabolismo fotossintético CAM que apresenta crescimento secundário característico de dicotiledôneas (Lüttge, 2006). *C. hilariana* e *C. spiritu-sanctensis* G. Mariz et Weinberg apresentam elevada ocorrência em restingas do Brasil. São encontradas como espécies centrais na formação aberta de *Clusia*, que se caracteriza por apresentar ilhas de vegetação intercaladas por áreas de areia desprovidas de vegetação, onde elevadas temperaturas e irradiância solar, salinidade e solos pobres dificultam a colonização via sementes (Pereira *et al.*, 2004; Scarano, 2002). Desta

forma, *Clusia* apresenta função facilitadora na dinâmica das comunidades vegetais na restinga. Pioneiras no substrato arenoso, ao seu entorno estabelecem uma grande diversidade de espécies vegetais, devido à acumulação de folhas secas, húmus e nutrientes, aumentando a capacidade de retenção de água, proteção da radiação solar e conseqüentemente das altas temperaturas do solo, contribuindo para a diversidade encontrada nesse ambiente (Zaluar e Scarano, 2000; Liebig *et al.*, 2001). Desta forma, quaisquer danos a essas espécies podem resultar em prejuízos enormes às comunidades vegetais nas quais estão inseridas.

O objetivo desse trabalho foi avaliar as alterações morfo-fisiológicas em *Clusia spiritus-sanctensis* e *Aspidosperma parvifolium*, duas espécies de restinga, submetidas em condições de campo e em casa de vegetação, à deposição de material sólido particulado de ferro (MSP_{Fe}) e SO_2 .

Material e métodos

Emissões de MSP_{Fe} e SO_2 em C. spiritus-sanctensis e A. parvifolium sob condições de campo

Mudas de *Clusia spiritus-sanctensis* G. Mariz et Weinberg (Clusiaceae) e *Aspidosperma parvifolium* A. DC. (Apocynaceae), com aproximadamente 18 meses de idade, foram obtidas em viveiro comercial situado na região de estudo, localizado no município de Guarapari, no Espírito Santo. As mudas foram transplantadas para vasos com solo com capacidade para 5 litros. Após período de aclimação foram selecionadas quanto à uniformidade no tamanho e estado fitossanitário e submetidas, sob condições de campo, à ação das emissões gasosas e particuladas de uma usina de pelotização de minério de ferro localizada no município de Anchieta, no litoral do Espírito Santo entre as coordenadas geográficas 20°46'S e 40°34'W. Outro grupo de plantas foi mantido em área referência, a 40 km da fonte emissora. Segundo a classificação de Köppen (1918) o clima da região é do tipo Aw, tropical quente e úmido com um a dois meses de seca. As avaliações foram realizadas em seis datas de amostragem ao longo de 15 meses de exposição, de abril de 2008 a julho de 2009.

O experimento foi montado em esquema fatorial 2×2×6 (duas espécies, duas condições de exposição ao MSP_{Fe} e 6 datas individuais de amostragem) com quatro

repetições. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, através do software Sistema de Análises Estatísticas Gerais (SAEG, 9.1 UFV).

Deposição de material particulado de ferro e da neblina ácida simulada em C. spiritusanctensis e A. parvifolium

Os experimentos foram executados sob condições de casa de vegetação da Unidade de Crescimento de Plantas (UFV; 20°45'S, 42°52'W). Foram conduzidos dois experimentos independentes, sendo um para cada espécie estudada. As plantas das duas espécies, de aproximadamente 18 meses de idade, foram obtidas em viveiro de plantas nativas localizado na região de Guarapari, ES. As mudas foram cultivadas em vasos contendo solo com capacidade para 5 litros. Após satisfatório crescimento, foram selecionadas e expostas aos tratamentos. Duas doses de MSP_{Fe} (0 e 6 mg $MSP_{Fe} \text{ cm}^{-2} \text{ dia}^{-1}$) foram aplicadas homogeneamente sobre a superfície do solo nos vasos. A dose de 6 mg $MSP_{Fe} \text{ cm}^{-2} \text{ dia}^{-1}$ corresponde à quantidade de MSP_{Fe} depositada no entorno de uma usina de beneficiamento de minério de ferro no litoral do Espírito Santo (Lopes *et al.*, 2000). Imediatamente após a aplicação do MSP_{Fe} as plantas foram submetidas a neblina simulada nos pH 3,0 (neblina ácida) e 6,5 (controle). A solução controle utilizada foi água desionizada e a neblina ácida consistiu em solução de ácido sulfúrico (H_2SO_4) diluído. Para as aplicações, foram utilizadas duas câmaras conforme modelo proposto por Evans *et al.* (1984) e adaptado por Alves (1990), uma para o controle e outra para a neblina ácida. As câmaras de aplicação eram constituídas por placas de acrílico transparente e quatro aspersores com sistema de “spray”, fixos no teto. Os aspersores lançavam sobre as plantas finas gotículas de neblina a um fluxo de 83 ml min^{-1} , sob pressão de 4,0 kg cm^{-2} . As plantas foram submetidas diariamente à neblina simulada por vinte minutos, no período de 07:15 a 08:30 hs. Nesse intervalo, as espécies apresentavam condutância estomática satisfatória, medida com o auxílio do IRGA. Antes e após a aplicação da neblina ácida as plantas foram expostas à intensidade luminosa de 1000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ durante 15 minutos. O experimento foi encerrado quando apareceram os primeiros sintomas visuais juntamente com efeitos significativos na taxa fotossintética.

Ambos os experimentos foram montados em esquema fatorial 2×2 (dois níveis de MSP_{Fe} e dois pH de chuva simulada) com 5 repetições em blocos casualizados. Os

dados obtidos foram submetidos à análise de variância, através do software Sistema de Análises Estatísticas Gerais (SAEG, 9.1 UFV).

Avaliação da deposição particulada de Fe e SO₂

A deposição de MP na superfície foliar das duas espécies expostas a diferentes condições de exposição em campo foi estimada conforme descrito por Kuki *et al.* (2008a). Foram utilizadas três folhas em cada repetição, nas quais o MP depositado foi coletado em frascos de vidro de peso conhecido, mediante lavagem das folhas com água desionizada. Os frascos foram, então, deixados à temperatura ambiente para a deposição do MSP no fundo dos frascos e então levados a estufa não-ventilada (40°C) até evaporação completa da água. Após resfriamento em temperatura ambiente, os frascos foram pesados novamente. Foi feita a medição da área das folhas utilizadas (Delta MK2 – Delta Devices Ltd, England). A quantidade de MP foi expressa em mg m⁻² de área foliar.

Avaliação das trocas gasosas

As medições de trocas gasosas foram efetuadas em folhas completamente expandidas das duas espécies. Em *C. spiritus-sanctensis* as medições foram feitas preferencialmente entre 23:00 hs e 02:00 hs, em que se observa a maior taxa de fixação do CO₂ pela fosfoenolpiruvato carboxilase – PEPC (fase I da fotossíntese CAM; Pereira *et al.*, 2009). Em *A. parvifolium* as medições foram feitas no início da manhã, preferencialmente entre 07:00 hs e 10:00 hs.

Foram avaliados: taxa fotossintética (A); condutância estomática (g_s) e razão entre a concentração interna e externa de CO₂ (C_i/C_a). Nos experimentos realizados em condições de campo foi utilizado o analisador de gás no infravermelho (IRGA) modelo LCi (ADC, Herts, UK) e nos experimentos realizados em casa de vegetação, foi utilizado o IRGA modelo LI-6400 (Li-Cor Inc., Lincoln, Nebraska, EUA).

Para eliminar possíveis efeitos devido a alterações climáticas durante o experimento de campo, os dados foram agrupados ao longo das datas de amostragem e apresentados graficamente na forma de Box-plot.

Avaliação da fluorescência da clorofila a

As avaliações das variáveis de fluorescência da clorofila *a*, foram feitas no início da manhã, nas mesmas folhas utilizadas nas medições de trocas gasosas.

No experimento de campo as medições foram feitas com o auxílio do fluorômetro de pulso modulado Mini-PAM (Heinz Walz, Effeltrich, Germany). Na antemanhã foram feitas medições da fluorescência mínima (F_0) e fluorescência máxima (F_m), utilizando luz de medição ($0,15 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e pulso de luz saturante ($5000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) por 0,8 s, respectivamente. Os valores obtidos foram utilizados para a determinação da eficiência quântica máxima do fotossistema II (PSII; $F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$) (Kitajima e Buter, 1975).

Após a determinação de F_v/F_m , o tecido vegetal foi exposto por 60 segundos à radiação fotossinteticamente ativa (PAR) com intensidade de $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Após o período de iluminação foi aplicado um pulso de luz saturante, para a determinação e cálculo das variáveis: F – fluorescência em *steady state*, antes do pulso de luz saturante; F_m' – fluorescência máxima do tecido vegetal iluminado; $\phi_{II} = \Delta F/F_m' = (F_m' - F)/F_m'$ – rendimento quântico efetivo do PSII no tecido vegetal iluminado (Genty *et al.*, 1989); $\phi_{NPQ} = F_s/F_m' - F_s/F_m$ – rendimento quântico de dissipação regulada de energia do PSII (Genty *et al.*, 1996); $\phi_{NO} = F_s/F_m$ – rendimento quântico de dissipação não-regulada de energia do PSII (Genty *et al.*, 1996).

Nos experimentos em casa de vegetação, imagens de fluorescência da clorofila *a*, em parte da superfície foliar, foram obtidas utilizando o fluorômetro modulado imaging-PAM (Heinz Walz, Effeltrich, Germany). Folhas das duas espécies, mantidas no escuro por no mínimo 50 minutos, foram dispostas a uma distância fixa sob um anel contendo 96 LEDs externos, que emitiram luz de medição, luz actínica e pulso de luz saturante, com pico de comprimento de onda aos 470 nm. As imagens das variáveis de fluorescência foram apresentadas com o auxílio de escala de cores, de acordo com a intensidade dos parâmetros de fluorescência, variando de preto (0,000) através de vermelho, amarelo, verde, azul até rosa (1,000).

As variáveis de fluorescência: F_0 , F_m , F_v/F_m , ϕ_{II} , ϕ_{NPQ} e ϕ_{NO} , foram determinadas como descritos anteriormente. Além destas, foram obtidos também outras variáveis: $q_p = (F_m' - F)/(F_m' - F_0)$ – dissipação fotoquímica (*quenching* fotoquímico); $NPQ = F_m - F_m'/F_m'$ – dissipação não fotoquímica (*quenching* não fotoquímico) (Bilger e Björkman, 1990). $ETR = \phi_{II} \times PAR \times 0,5 \times I_A$. – taxa aparente de transporte de elétrons através do

PSII. Em que 0,5 é a proporção de fótons destinados aos dois fotossistemas (Melis *et al.*, 1987) e I_A é a absorvância foliar, medida pelo fluorômetro Imaging-PAM. Devido ao fato dos fluorômetros modulados utilizados não possuírem uma fonte de luz vermelho-distante, necessária para a medição do F_0' , essa variável foi estimada de acordo com o fator de aproximação de Oxborough e Baker (1997): $F_0' = F_0/(F_v/F_m + F_0/F_m)$ – fluorescência mínima do tecido vegetal iluminado.

Avaliação dos teores de pigmentos

Os teores de pigmentos (clorofila *a*, *b* e carotenóides) foram determinados conforme protocolo descrito por Wellburn (1994) com a utilização de dimetilsulfóxido (DMSO) como extrator. Para ambas as espécies, três discos foliares de área conhecida foram expostos a 5 ml de DMSO saturado com carbonato de cálcio. Os discos foliares obtidos de *C. spiritu-sanctensis* permaneceram durante 48 horas em banho-maria a 65°C, enquanto os discos de *A. parvifolium* foram deixados à temperatura ambiente por 24 horas. Após o período de exposição, as absorvâncias dos extratos foram lidas e os teores dos pigmentos determinados e expressos em $\mu\text{g cm}^{-2}$.

Avaliação da permeabilidade de membranas

A permeabilidade relativa das membranas foi determinada em discos foliares, por meio do extravazamento de eletrólitos (Tarhanen *et al.*, 1999). Dez discos foliares de 5 mm de diâmetro foram colocados em recipientes de vidro com tampa, contendo 10 mL de água Mili-Q. Após 12 horas, a condutividade inicial (C_i), foi medida com auxílio de um condutímetro (MacCann e Solomon, 2000). Os tubos foram, então, colocados em banho maria a 90°C por duas horas e a condutividade final (C_f) determinada. A permeabilidade relativa foi calculada pela relação $C_i/(C_i+C_f) \times 100$ (Tarhanen *et al.*, 1999).

Determinação dos teores de malonaldeído (MDA)

Os teores de MDA acumulados, foram determinados em cerca de 200 mg de tecido vegetal, macerado em 4 ml de ácido tricloroacético (TCA) 0,1% (p/v), centrifugado a 10.000 xg por 15 minutos. A 500 μl do sobrenadante foram adicionados

1,5 ml da solução de ácido tiobarbitúrico 0,5% em TCA 20% e a mistura foi incubada à 95°C. Após 20 minutos a reação foi interrompida transferindo-se os tubos para banho de gelo e a absorbância medida a 532 e 600 nm. A absorbância de 600 nm foi subtraída da absorbância de 532 nm e a concentração de MDA foi calculada usando o coeficiente de extinção de $155 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Heath e Packer, 1968).

Detecção histoquímica de ferro e microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Detecção histoquímica de ferro e análises de MEV foram efetuadas em amostras foliares oriundas do experimento com deposição de MSP_{Fe} e neblina ácida simulada em casa de vegetação. Segmentos da porção mediana de folhas completamente expandidas foram fixados em tampão Karnovsky (Karnovsky, 1965). Para as análises em MEV, pequenos segmentos foliares foram desidratados lentamente em série etílica, secas ao ponto crítico de CO_2 (equipamento modelo CPD 020, Bal-Tec, Balzers, Liechtenstein), afixadas com fita a um suporte e cobertas com ouro em metalizador (equipamento Sputter Coater modelo FDU010, Bal-Tec, Balzers, Liechtenstein). A documentação fotográfica foi realizada em microscópio eletrônico de varredura (modelo Zeiss, LEO 1430 VP, Cambridge, Inglaterra) do Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV.

Para a detecção histoquímica de ferro foram obtidos manualmente cortes transversais das folhas de ambas as espécies. Após lavagem em água destilada, os segmentos foliares foram colocados em solução de ferricianeto de potássio 4% e ácido clorídrico 4% (Silva *et al.*, 2006), por período de 24 horas. Este teste evidencia a presença de ferro (Fe^{2+}) pela formação do Azul de Prússia. Foi conduzido em paralelo um controle negativo, no qual os cortes não foram expostos à reação. Após lavagem em água destilada, os segmentos foliares foram montados em lâminas com solução de glicerina a 50% e a documentação fotográfica foi realizada em fotomicroscópio (modelo AX70TRF, Olympus Optical, Tokio, Japão) equipado com sistema U-photo.

Determinação do teor de ferro, enxofre e nutrientes minerais

Os teores de ferro (Fe) e enxofre (S) foram determinados em folhas das plantas oriundas do experimento de campo. As folhas foram separadas, lavadas em água destilada e posteriormente imersas em solução de ditionito-citrato-bicarbonato (DCB) por uma hora, com agitação periódica, para remoção do ferro aderido na superfície

foliar externa. Aproximadamente 10 g do material a fresco de folhas foram colocados em solução de 100 mL de citrato de sódio 0,03 M ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) e bicarbonato de sódio 0,125 M (NaHCO_3), com adição de 0,6 g de ditionito de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) (Taylor and Crowder, 1983). Após este procedimento, as folhas foram lavadas três vezes em água destilada.

Os teores de Fe, S, magnésio (Mg), fósforo (P), zinco (Zn), manganês (Mn), cobre (Cu) e nitrogênio (N) foram determinados nos tecidos foliares das plantas do experimento com deposição de MSP_{Fe} e neblina ácida simulada em casa de vegetação. Folhas das duas espécies foram lavadas três vezes em água destilada.

Posteriormente, em todos os experimentos, as folhas foram colocadas em estufa para secagem a 75°C até atingir peso constante e foram reduzidas a partículas com dimensões menores que 1 mm. Para as determinações de Fe, S, Mg, P, Zn, Mn e Cu o material vegetal foi digerido em solução nítrico-perclórica (3:1), sendo o teor dos nutrientes no extrato mineral resultante, determinado por espectrofotometria de absorção atômica (Kampfinkel *et al.*, 1995). A quantificação de N foi determinada por titulação após digestão do material vegetal seco em mistura digestora contendo selenito de sódio; sulfato de sódio; sulfato de cobre pentahidratado e ácido sulfúrico concentrado. O procedimento seguiu destilação em microdestilador Kjeldahl, conforme metodologia proposta por Malavolta *et al.* (1997).

Resultados

Emissões de MSP_{Fe} e SO_2 em C. spiritu-sanctensis e A. parvifolium sob condições de campo

A quantidade de material particulado (MP) depositado diferiu significativamente quanto ao local de exposição das plantas aos poluentes (Fig. 1). Ao longo de todo o período amostral as plantas situadas próximas à fonte poluidora apresentaram maior quantidade de MP aderido à superfície foliar. Com exceção da última data amostrada (julho de 2009), houve maior acúmulo de MP nas folhas de *C. spiritu-sanctensis*. Nessa espécie fica claro o padrão de sazonalidade das deposições, com diferenças entre os meses de início e meio de ano.

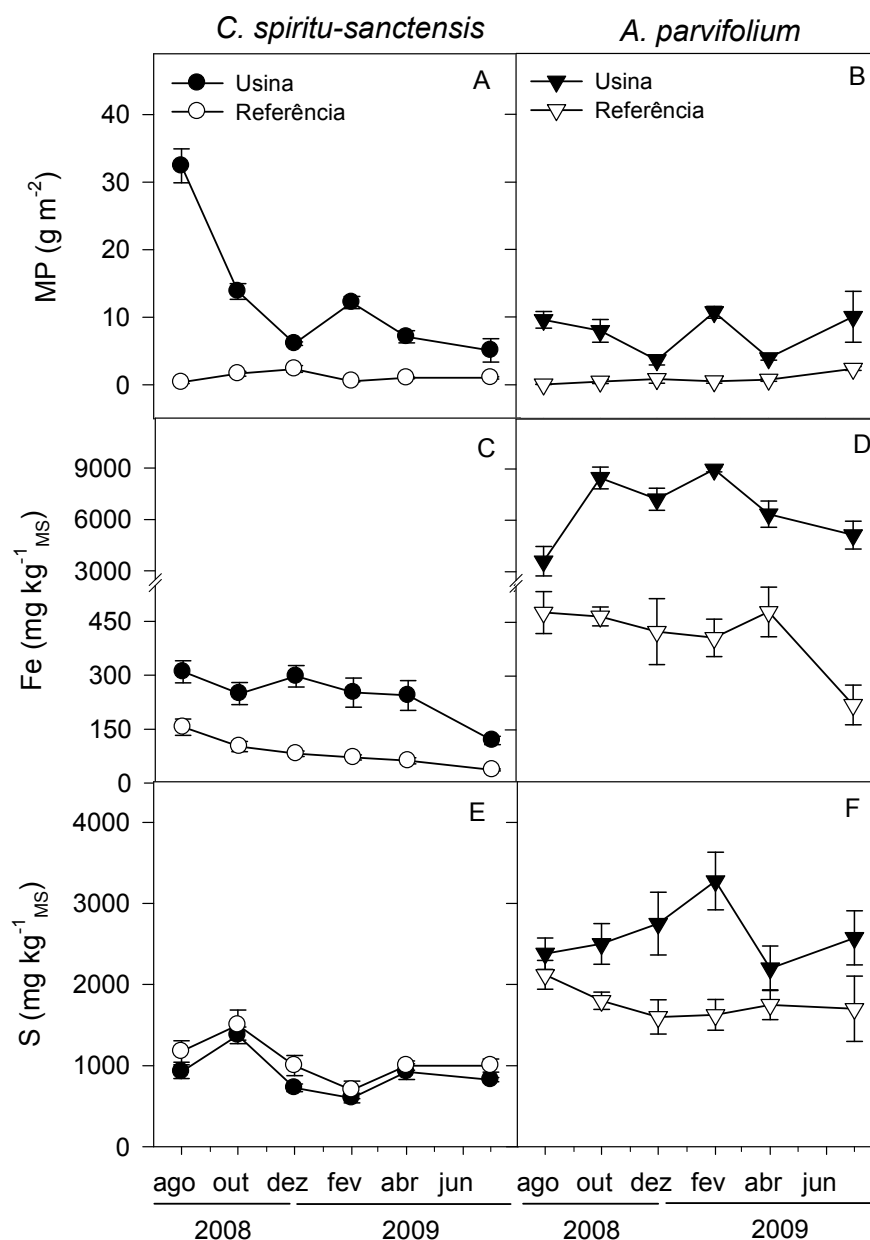


Figura 1: Deposição de material particulado (MP; A e B), teor de ferro (Fe) nos tecidos foliares (C e D) e enxofre (S) em plantas de *Clusia spiritu-sanctensis* (painéis da esquerda) e *Aspidosperma parvifolium* (painéis da direita) ao longo de um ano de exposição em área próxima a usina de beneficiamento de minério de ferro e em área referência.

Assim como a deposição de MP, o teor de ferro (Fe) nos tecidos foliares de ambas as espécies foi superior na área próxima à usina de beneficiamento de minério de ferro. Entretanto, o teor de enxofre (S) apenas diferiu significativamente entre os locais de exposição para *A. parvifolium*. Esta espécie, nos dois locais de exposição, apresentou os maiores teores de Fe e S em relação a *C. spiritu-sanctensis* (Fig. 1).

Nas duas espécies foram observadas reduções na taxa fotossintética (A) em resposta à deposição de MP (Fig. 2). Em *C. spiritu-sanctensis* as diferenças na

condutância estomática (g_s) foram mais claramente evidenciadas. Esta espécie apresentou os menores valores de g_s e maior razão entre a concentração interna e externa de CO_2 (C_i/C_a) quando exposta aos poluentes (Fig. 2).

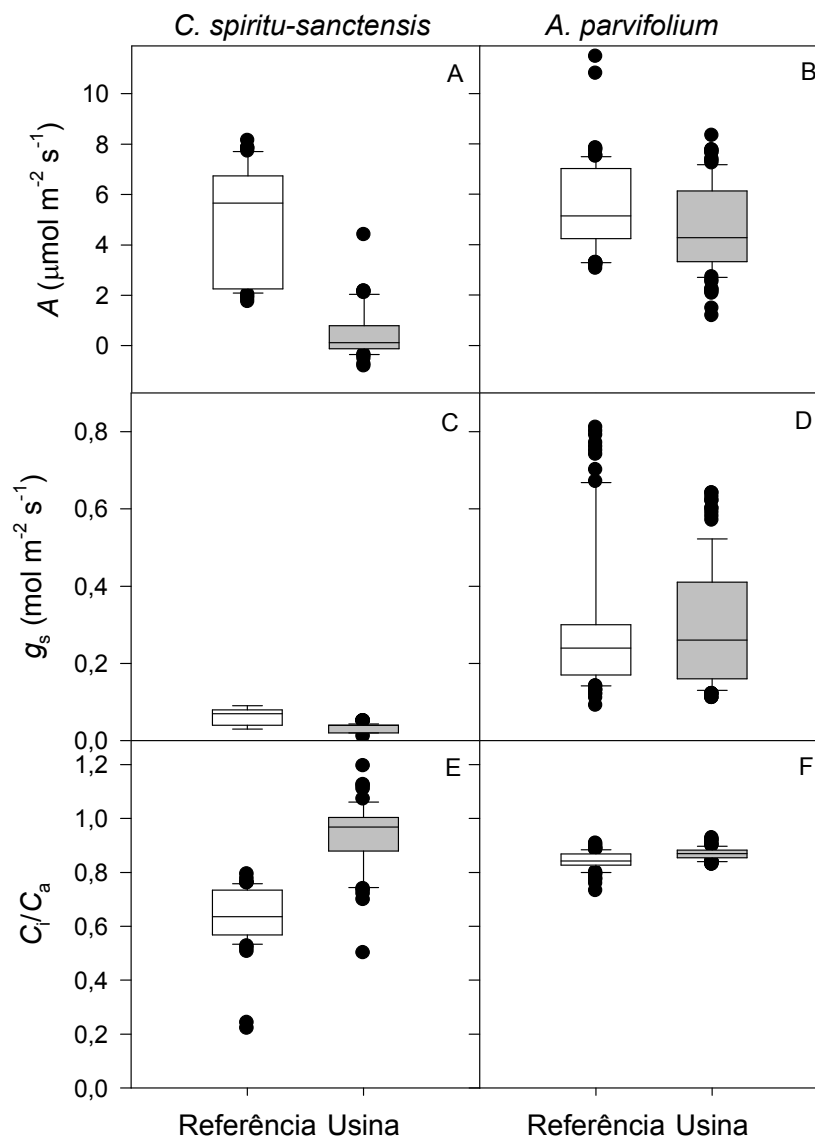


Figura 2: Análise em Box-plot das variáveis de trocas gasosas em *Clusia spiritus-sanctensis* (painéis da esquerda) e *Aspidosperma parvifolium* (painéis da direita) em área próxima a usina de beneficiamento de minério de ferro e em área referência. A e B: taxa fotossintética (A); C e D: condutância estomática (g_s); E e F: razão entre a concentração interna e externa de CO_2 (C_i/C_a). No Box-plot é mostrado a mediana, o 25° e o 75° percentil e as barras mostram o valor máximo e mínimo seguidos de *outliers*. *C. spiritus-sanctensis*: $n=46$ (referência), $n=56$ (usina); *A. parvifolium*: $n=90$ (referência), $n=105$ (usina). Os dados foram agrupados ao longo de um ano de avaliação.

C. spiritus-sanctensis apresentou maior eficiência quântica máxima do PSII (F_v/F_m) e maior rendimento quântico efetivo (ϕ_{II}) do PSII em relação a *A. parvifolium* (Fig. 3). Entretanto, na primeira espécie foram encontrados os menores valores para rendimento quântico de dissipação não-fotoquímica regulada (ϕ_{NPQ}) em todas as datas de amostragem.

As plantas expostas à deposição de MP no entorno da usina de pelotização de minério de Fe apresentaram reduzido ϕ_{NPQ} e elevado rendimento quântico de dissipação não fotoquímica não regulada (ϕ_{NO}). Essa diferença torna-se clara no mês de dezembro de 2008 (Fig. 3). Somente em agosto de 2008 e julho de 2009 *C. spiritus-sanctensis* apresentou valores de ϕ_{NO} superiores aos encontrados em *A. parvifolium* (Fig. 3).

De forma geral, a exposição das plantas aos poluentes em área próxima a usina resultou em incremento apenas nos teores de clorofila *a* (Fig. 4). Os teores de clorofila *b* e carotenóides não sofreram alterações significativas em decorrência da deposição de MP. *C. spiritus-sanctensis* apresentou os maiores teores de pigmentos (Fig. 4). Em todos os pigmentos fotossintéticos avaliados foram observadas diferenças significativas entre as datas de amostragem, independentemente da espécie ou do local de exposição.

O dano às membranas medido pelo extravasamento de eletrólitos, apresentou respostas distintas em relação às espécies estudadas e à deposição de MP. *A. parvifolium* apresentou os maiores valores quando exposta aos poluentes. Em *C. spiritus-sanctensis* o contrário foi observado (Fig. 5).

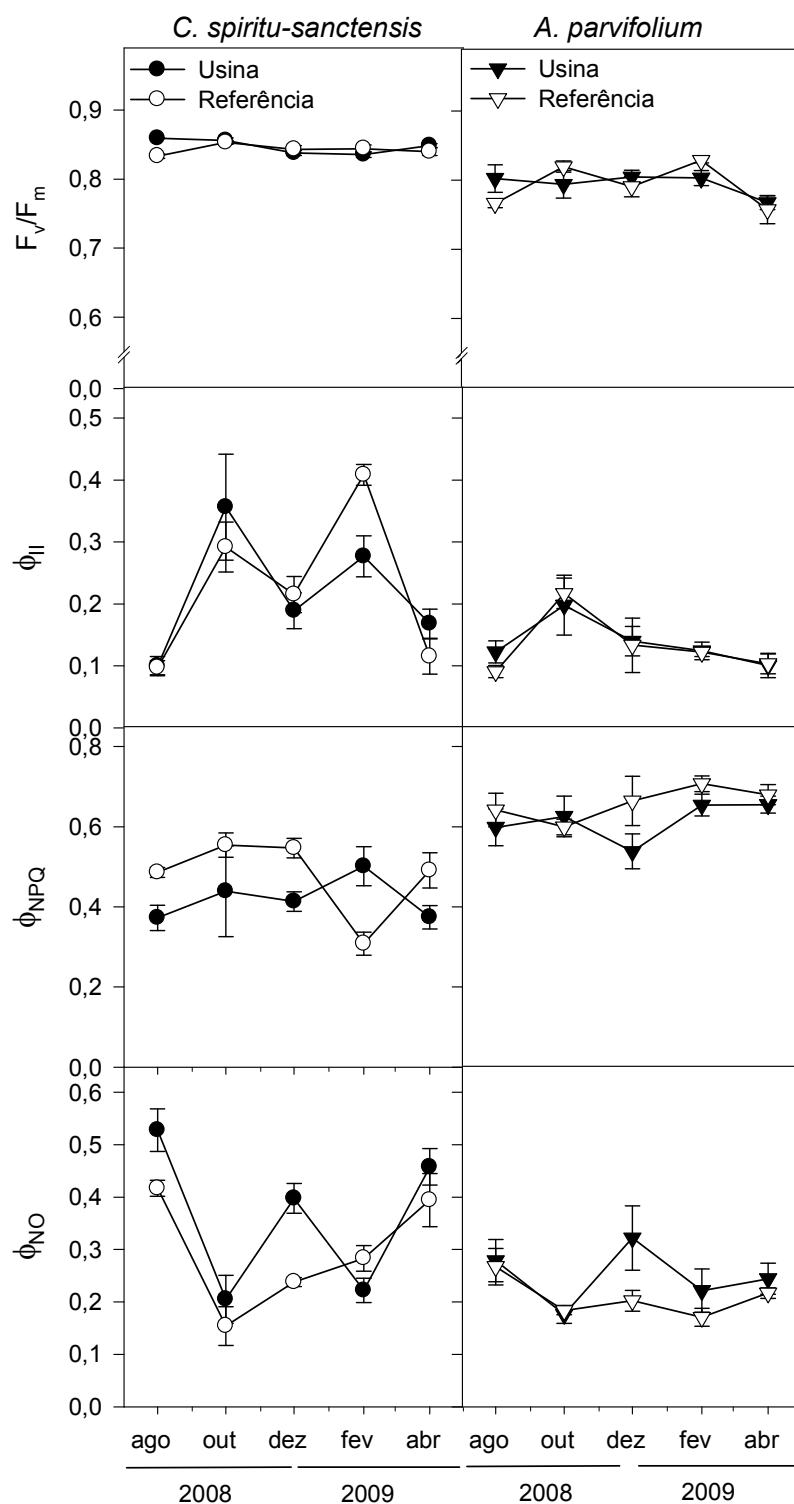


Figura 3: Alterações na eficiência quântica máxima do PSII (F_v/F_m), rendimento quântico efetivo do PSII (ϕ_{II}), rendimentos quânticos de dissipação não-fotoquímica regulada (ϕ_{NPQ}) e não-regulada (ϕ_{NO}) em *Clusia spiritus-sanctensis* (painéis da esquerda) e *Aspidosperma parvifolium* (painéis da direita) ao longo de um ano de exposição aos poluentes em área próxima a usina de beneficiamento de minério de ferro e em área referência.

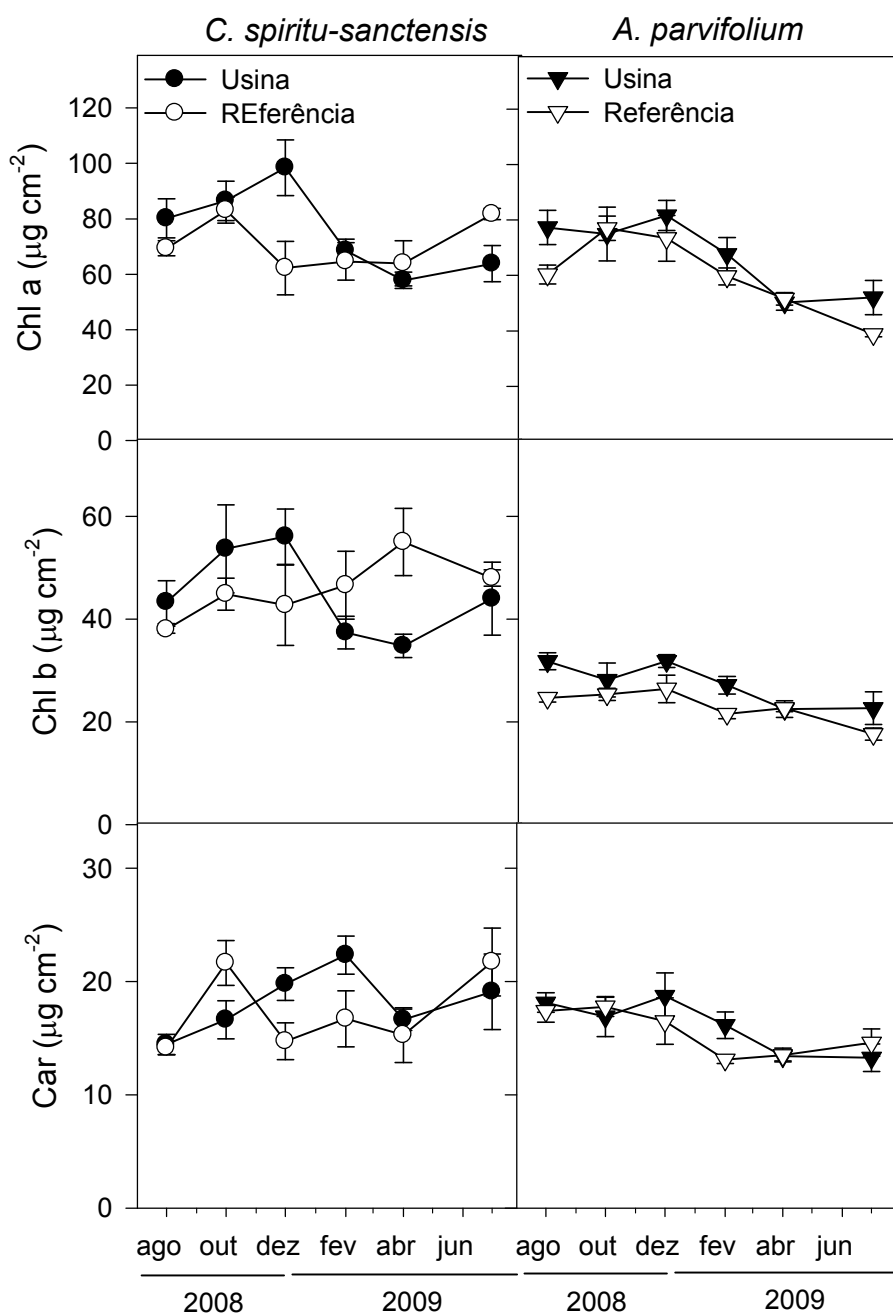


Figura 4: Alterações nos teores de clorofila *a* (Chl *a*), clorofila *b* (Chl *b*) e carotenóides (Car) em *Clusia spiritus-sanctensis* (painéis da esquerda) e *Aspidosperma parvifolium* (painéis da direita) ao longo de um ano de exposição em área próxima a usina de beneficiamento de minério de ferro e em área referência.

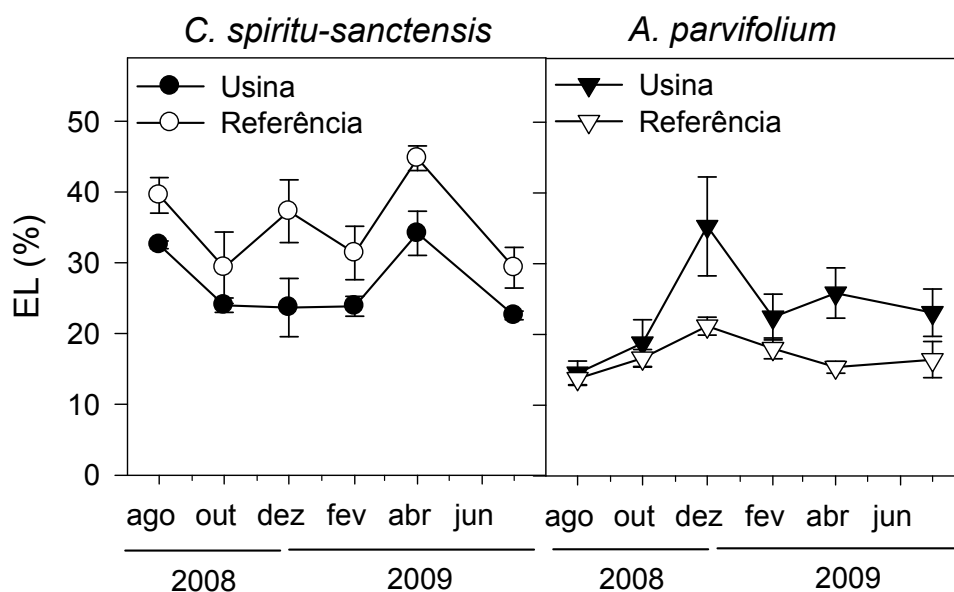


Figura 5: Alterações no extravasamento de eletrólitos (EL) em *Clusia spiritus-sanctensis* (painéis da esquerda) e *Aspidosperma parvifolium* (painéis da direita) ao longo de um ano de exposição em área próxima a usina de beneficiamento de minério de ferro e em área referência.

Deposição de material particulado de ferro e da neblina ácida simulada em C. spiritus-sanctensis e A. parvifolium

A aplicação de neblina ácida simulada levou ao aparecimento das primeiras necroses principalmente na face adaxial de folhas jovens de *A. parvifolium* após três dias de tratamento. Em *C. spiritus-sanctensis* as necroses somente foram observadas após 30 dias de exposição à neblina ácida. Após redução significativa na taxa fotossintética, que ocorreu aos 30 e 100 dias de aplicação dos tratamentos em *A. parvifolium* e *C. spiritus-sanctensis*, respectivamente, foram feitas as avaliações destrutivas e coleta de material vegetal.

Os sintomas na superfície foliar observados nos tratamentos com aplicação de neblina ácida simulada (isolada ou em combinação com MSP_{Fe}) foram similares nas duas espécies (Fig. 6 e 7). Nessas plantas, as necroses apresentaram aspecto de protuberâncias na face adaxial (Fig. 6-H e 7-I). Em *A. parvifolium*, além das protuberâncias foram observadas perfurações da epiderme (Fig. 7-G).

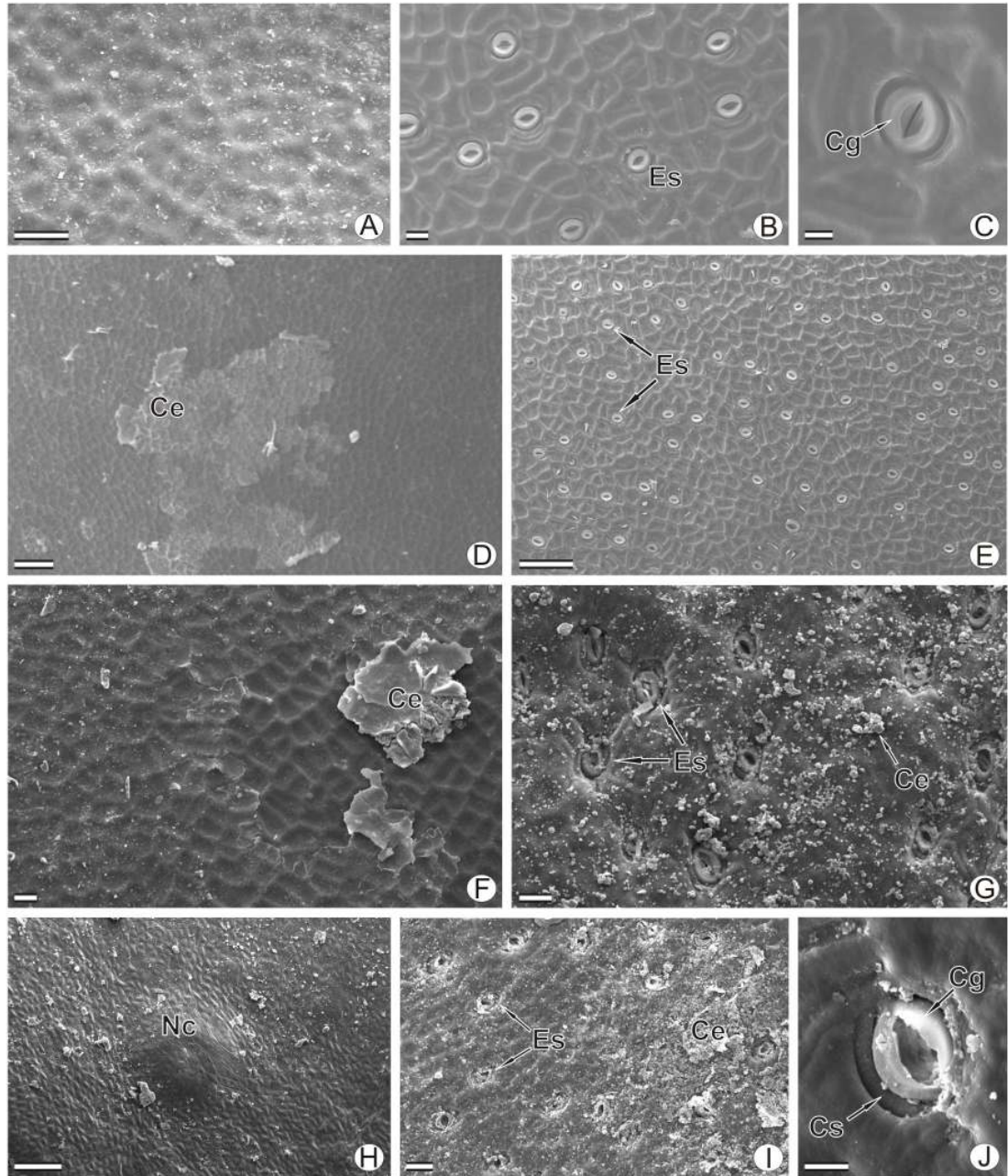


Figura 6: Superfície foliar adaxial (A, D, F e H) e abaxial (B, C, E, G, I e J) de *Clusia spiritus-sanctensis* após 100 dias de aplicação de neblina ácida simulada e MSP_{Fe} . Tratamento controle (A - C); com aplicação de MSP_{Fe} ao solo (D e E); com aplicação de neblina ácida simulada pH 3,0 (F e G) e com combinação entre neblina ácida simulada e MSP_{Fe} no solo (H - J). Es: estômato; Cg: célula-guarda; Cs: célula subsidiária; Ce: cera epicuticular; Nc: necrose. Barras: 100 μm (D, E e H); 30 μm (I); 20 μm (A, B e G); 10 μm (C e J).

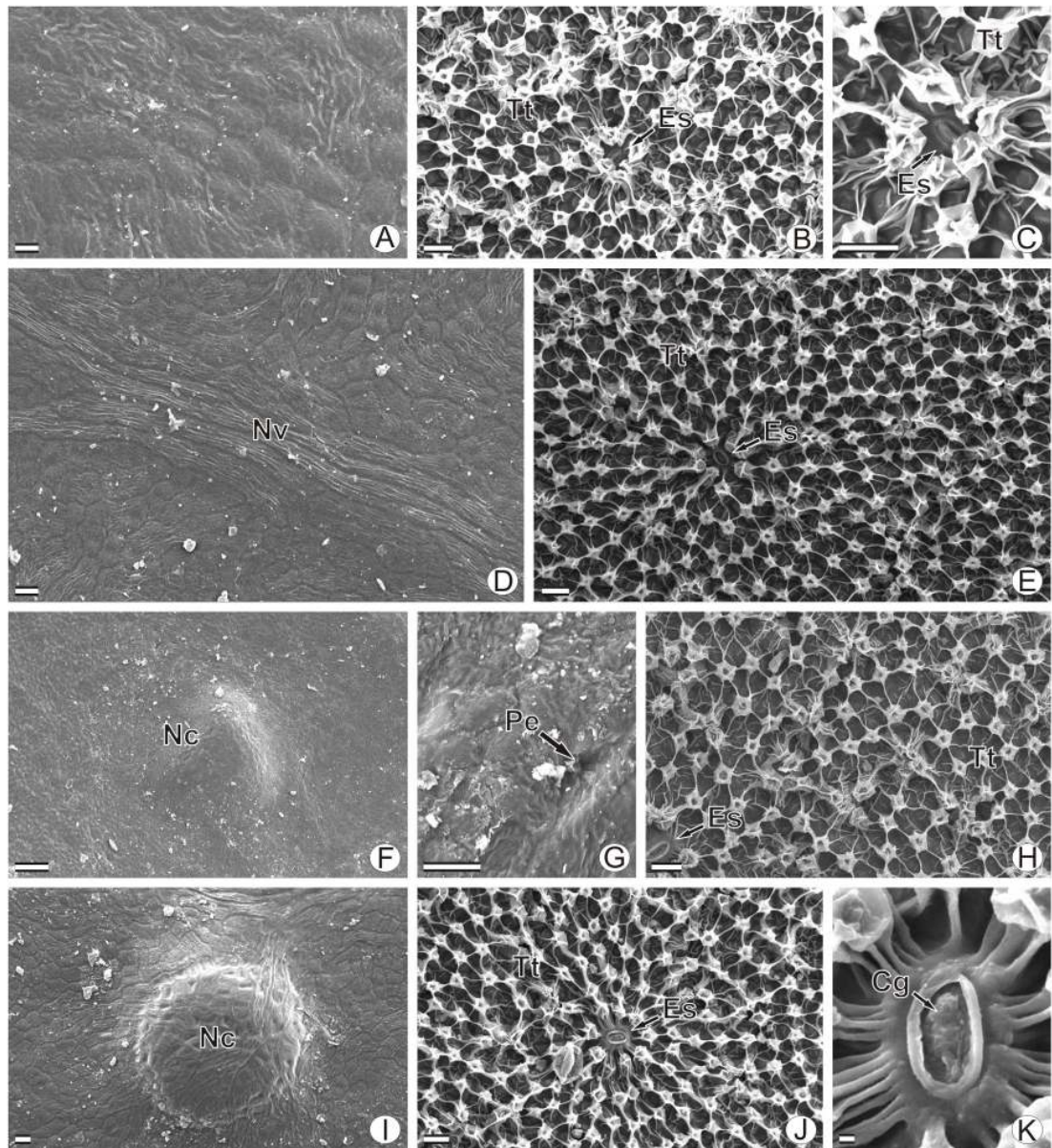


Figura 7: Superfície foliar adaxial (A, D, F, G e I) e abaxial (B, C, E, H, J e K) de *Aspidosperma parvifolium* após 30 dias com aplicação de neblina ácida simulada e MSP_{Fe} . Tratamento controle (A - C), com deposição de MSP_{Fe} no solo (D e E), com aplicação de neblina ácida simulada pH 3,0 (F - H) e a combinação entre neblina ácida simulada e MSP_{Fe} no solo (I - K). Tt: tricoma tector; Es: estômato; Cg: célula-guarda; Nv: nervura; Nc: necrose; Pe: perfuração. Barras: 100 μm (F); 20 μm (B - E, G - J); 2 μm (K).

Na epiderme adaxial e abaxial de *C. spiritus-sanctensis* houve escamação da cera epicuticular (Fig. 6-F). Os estômatos, vistos somente na superfície abaxial em ambas as espécies, apresentaram aspecto deformado em resposta à acidez da neblina simulada. Em *C. spiritus-sanctensis* as células-guarda tornaram-se totalmente alteradas, flácidas e com a parede danificada (Fig. 6-G,I,J). Comumente foram observadas ruptura da crista

estomática. As células subsidiárias apresentaram aspecto retorcido e descolamento das células-guarda (Fig. 6-J). Os numerosos tricomas tectores na epiderme abaxial de *A. parvifolium* dificultaram a clara observação dos sintomas. Entretanto, a desestruturação no arranjo dos tricomas foi observada em decorrência dos tratamentos com neblina ácida simulada (Fig. 7-H,J). Nessa espécie, os estômatos comumente estão dispostos no interior de regiões densamente cobertas pelos tricomas (Fig. 7-B,C,E,H,J). Da mesma forma que em *C. spiritus-sanctensis*, em *A. parvifolium* também foram observadas alterações na estrutura das células-guarda (Fig. 7-K). Comumente foi observado obstrução do poro estomático em decorrência da desestruturação das células-guarda e acúmulo de cera epicuticular (Fig. 7-J,K). Nas plantas submetidas aos tratamentos com aplicação de MSPFe no solo e com neblina simulada em pH 6,5 observa-se células-guarda intactas e subsidiárias organizadas, além do padrão homogêneo de distribuição da cera epicuticular (Fig. 6 e Fig. 7).

O ferro foi localizado histoquimicamente em diversos tecidos foliares em *C. spiritus-sanctensis* e *A. parvifolium*, com evidente distinção entre os tratamentos, principalmente em *C. spiritus-sanctensis*, com pouca intensidade de coloração nos tratamentos sem aplicação de neblina ácida (Fig. 8). Nas duas espécies o ferro foi detectado principalmente nas células da epiderme e do floema (Fig. 8 e 9). Em *C. spiritus-sanctensis* houve formação do Azul da Prússia com maior intensidade em relação à *A. parvifolium* nas células da hipoderme, colênquima e no clorênquima (Fig. 8 e 9). Os tricomas da epiderme abaxial em *A. parvifolium* também apresentaram coloração positiva ao ferro (Fig. 9-H).

O teor de ferro nas folhas de *C. spiritus-sanctensis* e *A. parvifolium* aumentou significativamente com a neblina ácida simulada isoladamente (NA) e em combinação (CB) com o MSP_{Fe} aplicado ao solo (Tab. 1). Em *C. spiritus-sanctensis* os maiores valores foram observados nas plantas que receberam apenas a neblina ácida simulada. Não houve alterações nos teores foliares de fósforo (P), enxofre (S), manganês (Mn) e cobre (Cu) nas duas espécies estudadas. Entretanto, somente em *A. parvifolium* foram observadas reduções nos teores foliares de nitrogênio (N), magnésio (Mg) e também zinco (Zn) em decorrência da neblina ácida simulada (Tab. 1). No geral, *A. parvifolium* apresentou os maiores teores de Fe, N e Mg. Por outro lado, os teores de P, Zn, Cu e Mn foram maiores em *C. spiritus-sanctensis* (Tab. 1).

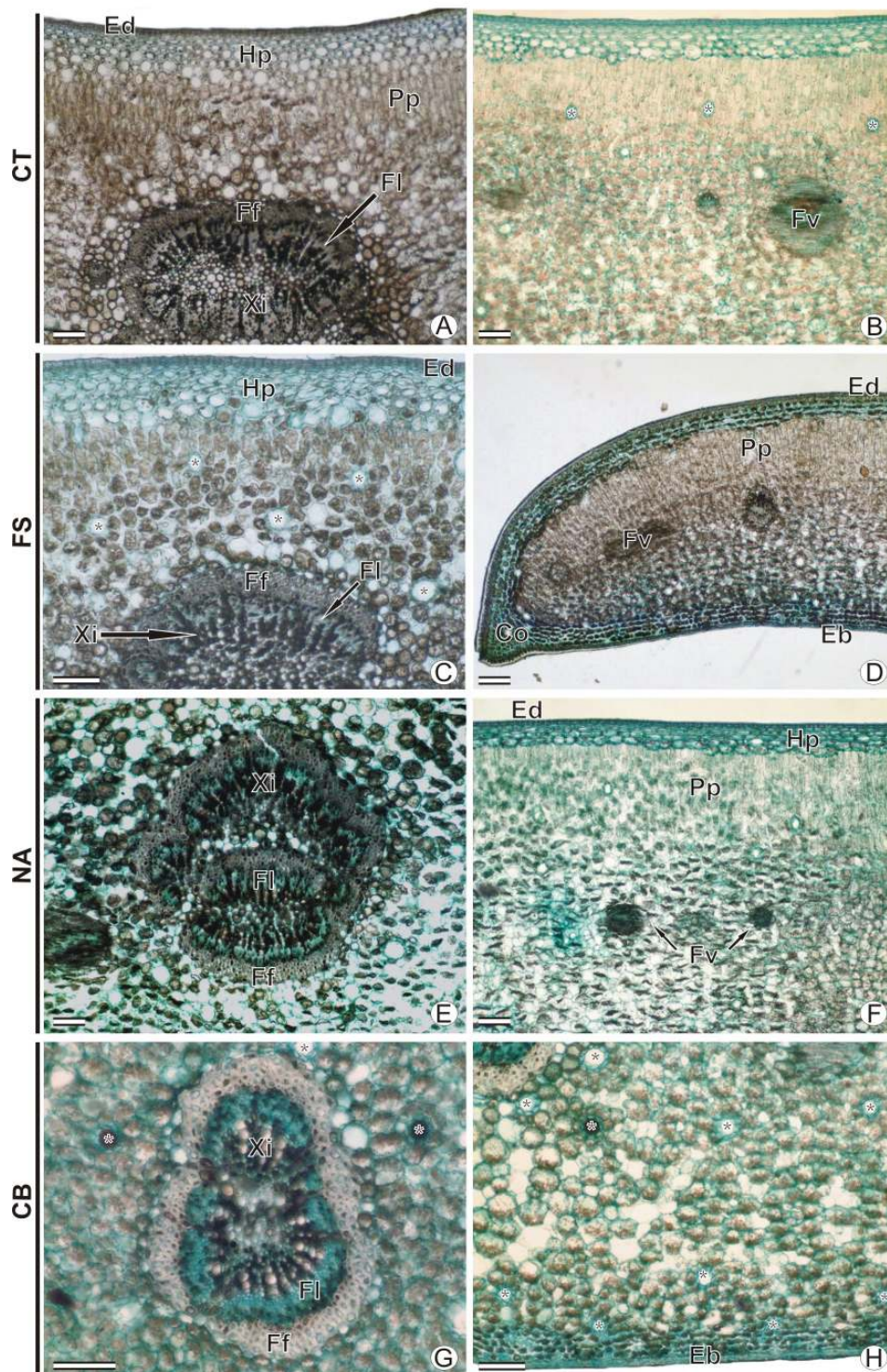


Figura 8: Detecção histoquímica de ferro em cortes transversais da lâmina foliar de *Clusia spiritus-sanctensis* após 100 dias com aplicação de neblina ácida simulada e MSP_{Fe} . Tratamento controle (CT; A e B), com deposição de MSP_{Fe} no solo (FS; C e D), com aplicação de neblina ácida simulada pH 3,0 (NA; E e F) e a combinação entre neblina ácida simulada e MSP_{Fe} no solo (CB; G e H). Xi: xilema; Fl: floema; Ff: fibra do floema; Fv: feixe vascular; Ed: epiderme adaxial; Eb: Epiderme abaxial; Hp: hipoderme, Pp: parênquima paliçádico; Co: colênquima; *: ductos. Barras: 200 μm (A - H).

Nas duas espécies estudadas, o fator determinante para as reduções significativas na taxa fotossintética foi o pH ácido da neblina simulada (Fig. 10). As alterações mais drásticas foram observadas em *A. parvifolium*. Nessa espécie houve diminuição em g_s . Em nenhuma das espécies foram observadas mudanças significativas em C_i/C_a .

Não foram observadas diferenças significativas para as espécies nos seguintes parâmetros de fluorescência da clorofila *a*: F_0 ; F_v/F_m ; ϕ_{NO} ; ϕ_{NPQ} e NPQ (Fig 11 e 12). A aplicação de neblina ácida simulada, independentemente da dose de MSP_{Fe} , causou reduções significativas na taxa aparente de transporte de elétrons (ETR) e ϕ_{II} em ambas as espécies (Fig. 11 e 12). Em *C. spiritu-sanctensis* houve redução do quenching fotoquímico (q_p) quando as plantas foram submetidas à neblina ácida simulada. Já em *A. parvifolium* tal redução somente ocorreu com a combinação de neblina ácida e deposição de MSP_{Fe} (Fig. 11). Novamente *C. spiritu-sanctensis* apresentou os maiores valores de F_v/F_m , ϕ_{II} e também de q_p e ETR.

Somente em *C. spiritu-sanctensis* os teores de pigmentos fotossintéticos (clorofilas *a*, *b* e carotenóides) apresentaram incrementos significativos em resposta ao MSP_{Fe} aplicado sobre o solo (Tab. 2). Não houve mudanças referentes à aplicação de neblina ácida simulada em nenhuma das espécies estudadas.

A concentração de malonaldeído (MDA) nos tecidos foliares de ambas as espécies foi maior nos tratamentos com neblina ácida (Tab. 2). O extravasamento de eletrólitos não apresentou alterações significativas em função dos tratamentos.

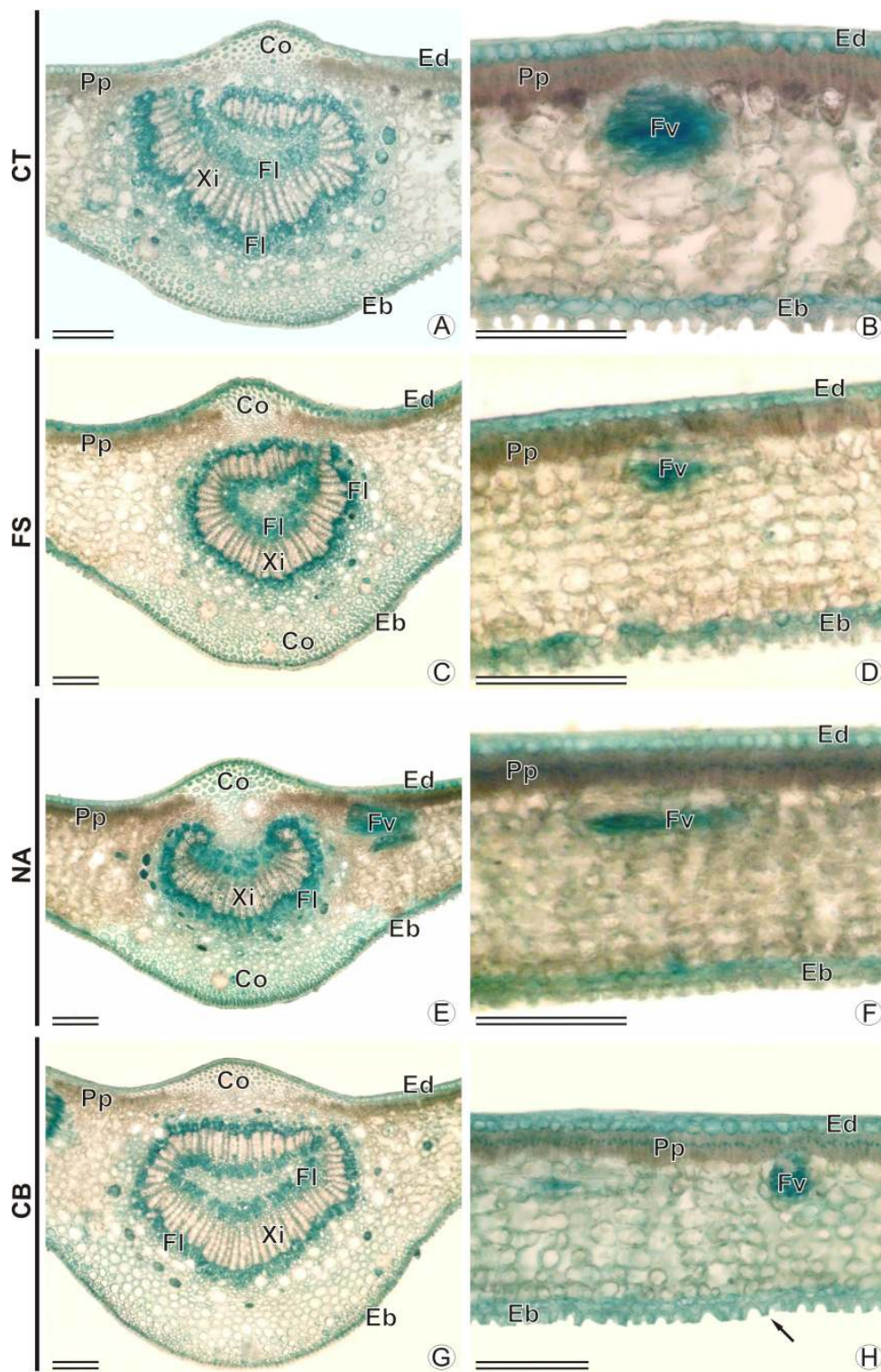


Figura 9: Detecção histoquímica de ferro em cortes transversais da lâmina foliar de *Aspidosperma parvifolium* após 30 dias com aplicação de neblina ácida simulada e MSP_{Fe} . Tratamento controle (CT; A e B), com deposição de MSP_{Fe} no solo (FS; C e D), com aplicação de neblina ácida simulada pH 3,0 (NA; E e F) e a combinação entre neblina ácida simulada e MSP_{Fe} no solo (CB; G e H). Xi: xilema; FI: floema; Ff: fibra do floema; Fv: feixe vascular; Ed: epiderme adaxial; Eb: Epiderme abaxial; Pp: parênquima paliádico; Co: colênquima; seta: tricoma. Barras: 200 μ m (A - H).

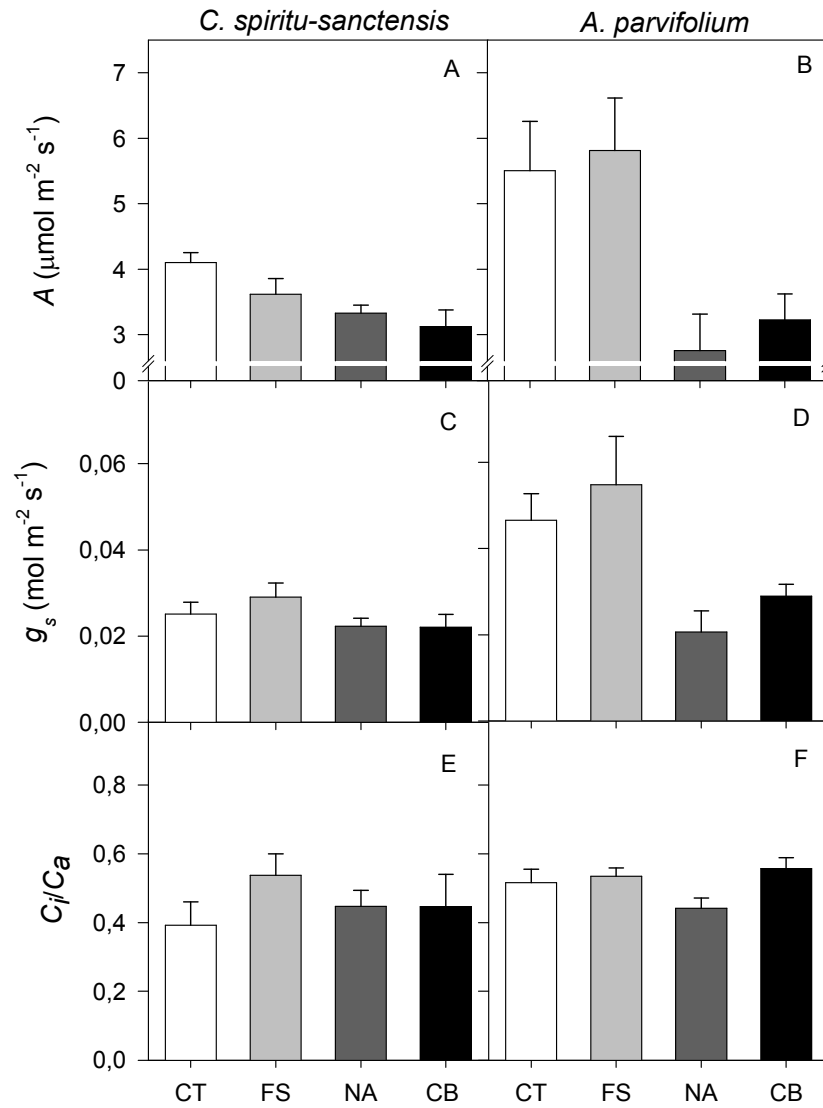


Figura 10: Alterações na taxa fotossintética (A ; A e B), condutância estomática (g_s ; C e D); razão entre a concentração interna e externa de CO_2 (C_i/C_a ; E e F) em *Clusia spiritus-sanctensis* (painéis da esquerda) e *Aspidosperma parvifolium* (painéis da direita) em resposta a aplicação de neblina ácida simulada e MSP_{Fe} . Tratamento controle (CT), com deposição de MSP_{Fe} no solo (FS), com aplicação de neblina ácida simulada pH 3,0 (NA) e a combinação entre neblina ácida simulada e MSP_{Fe} no solo (CB).

Tabela 1: Teor foliar de ferro e outros nutrientes minerais ($\text{mg kg}^{-1}_{\text{MS}}$) em *Clusia spiritus-sanctensis* e *Aspidosperma parvifolium* em resposta à aplicação de neblina ácida simulada e MSP_{Fe} . Tratamento controle (CT), com aplicação de MSP_{Fe} no solo (FS), com aplicação de neblina ácida simulada pH 3,0 (NA) e a combinação entre neblina ácida simulada e MSP_{Fe} no solo (CB). Níveis de significância: $p < 0.05$ (*); $p < 0.01$ (**); $p < 0.001$ (***) ; n.s. (não significativo). Dados são média e erro padrão de cinco repetições.

		Fe	Zn	Mn	Cu	N	P	Mg	S
<i>C. spiritus-sanctensis</i>	CT	39,8±2,8	32,4±5,3	372,0±67,2	7,6±1,0	8460±821	1400±164	3620±235	1680±124
	NA	88,8±4,4	40,8±5,0	299,2±17,9	6,8±1,1	7800±469	1440±75	3400±63	1960±133
	FS	41,2±3,0	41,2±2,4	366,2±54,3	8,2±0,9	9080±576	1520±111	3860±289	1680±325
	CB	72,2±3,7	48,2±3,4	376,6±31,2	8,8±0,8	8580±280	1500±45	3840±262	1720±185
<i>Análise de variância</i>									
	<i>MSP_{Fe}</i>	*	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	<i>pH</i>	***	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	<i>MSP_{Fe} × pH</i>	*	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	<i>Bloco</i>	n.s.	n.s.	n.s.	*	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<i>A. parvifolium</i>	CT	98,6±7,0	16,4±1,1	106,2±16,5	3,4±0,5	22000±719	1040±125	5040±277	1380±193
	NA	191,2±21,5	13,6±0,5	79,6±7,7	3,2±0,4	21188±559	960±81	3820±248	2020±526
	FS	100,0±13,7	16,4±0,9	69,6±13,2	3,0±0,3	24040±689	1080±86	4460±204	1640±248
	CB	161,0±15,3	14,4±0,5	78,6±9,5	3,6±0,2	20940±998	1140±144	4120±139	1920±139
<i>Análise de variância</i>									
	<i>MSP_{Fe}</i>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	<i>pH</i>	***	*	n.s.	n.s.	*	n.s.	***	n.s.
	<i>MSP_{Fe} × pH</i>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	*	n.s.
	<i>Bloco</i>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	*	n.s.

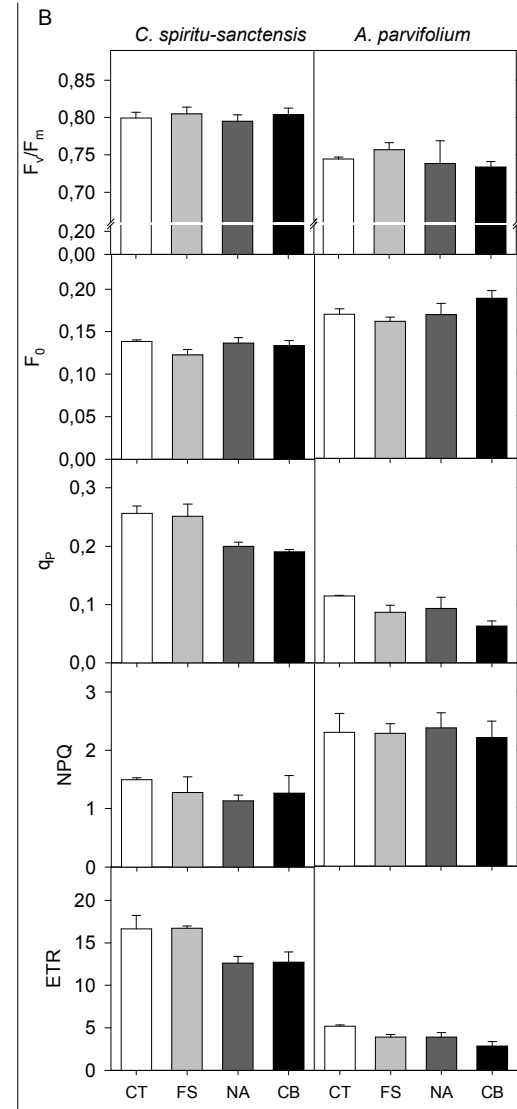
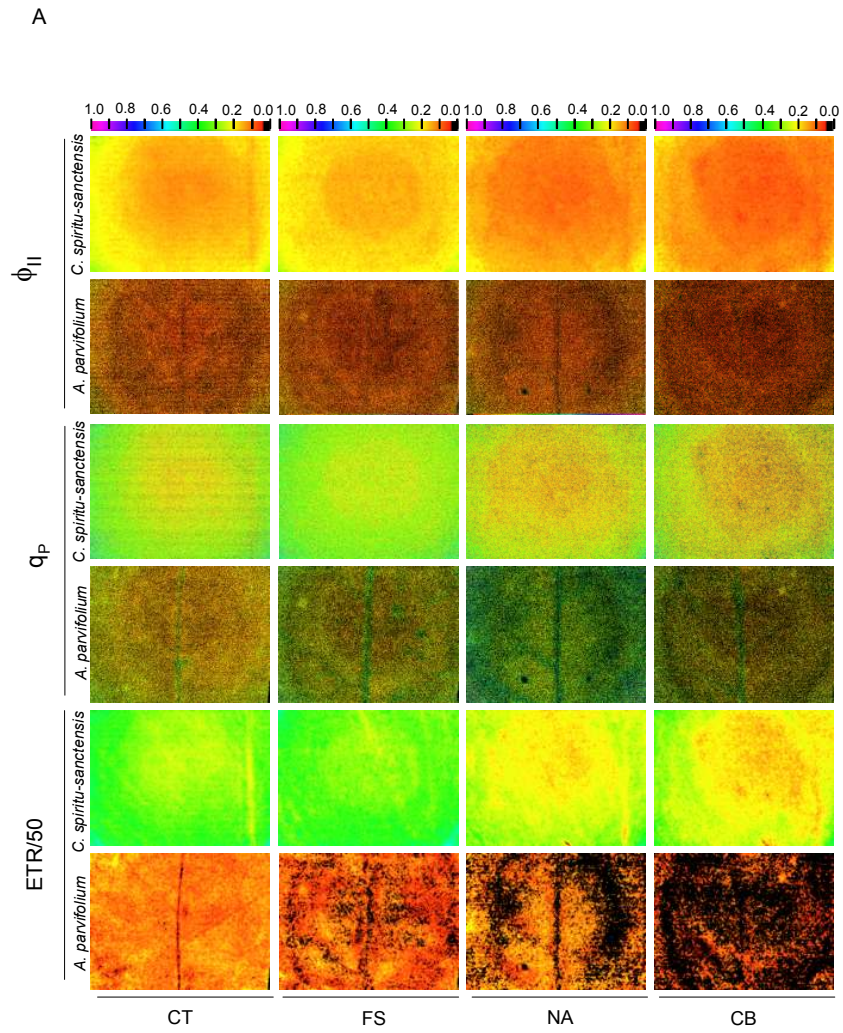


Figura 11: Imagens dos parâmetros de fluorescência da clorofila (A) e representações gráficas (B) da eficiência quântica máxima do PSII (F_v/F_m), fluorescência mínima (F_0), *quenching* fotoquímico (q_p) e não-fotoquímico (NPQ) e taxa aparente de transporte de elétrons no PSII (ETR) em *Clusia spiritu-sanctensis* (painéis da esquerda) e *Aspidosperma parvifolium* (painéis da direita) em resposta a aplicação de neblina ácida simulada e MSP_{Fe} . Tratamento controle (CT), com deposição de MSP_{Fe} no solo (FS), com aplicação de neblina ácida simulada pH 3,0 (NA) e a combinação entre neblina ácida simulada e MSP_{Fe} no solo (CB). O parâmetro NPQ foi dividido por 50 nas imagens para se adequar à escala de cores.

Tabela 2: Teor de malonaldeído (MDA; $nmol\ g^{-1}_{MF}$) e extravasamento de eletrólitos (EL; %) em *Clusia spiritu-sanctensis* e *Aspidosperma parvifolium* em resposta a aplicação de neblina ácida simulada e MSP_{Fe} . Tratamento controle (CT), com deposição de MSP_{Fe} no solo (FS), com aplicação de neblina ácida simulada pH 3,0 (NA) e a combinação entre neblina ácida simulada e MSP_{Fe} no solo (CB). Níveis de significância: $p < 0.05$ (*); n.s. (não significativo). Dados são média e erro padrão de cinco repetições.

	<i>C. spiritu-sanctensis</i>		<i>A. parvifolium</i>	
	MDA	EL	MDA	EL
CT	5,89±1,2	19,14±1,0	18,44±1,2	13,48±0,8
NA	7,76±1,1	17,61±0,9	23,62±1,7	14,90±0,9
FS	6,15±0,7	18,89±0,8	19,70±1,4	14,55±1,2
CB	9,13±1,3	20,13±1,3	20,99±1,0	14,60±0,9
<i>Análise de variância</i>				
<i>MSP_{Fe}</i>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<i>pH</i>	*	n.s.	*	n.s.
<i>MSP_{Fe} × pH</i>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<i>Bloco</i>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

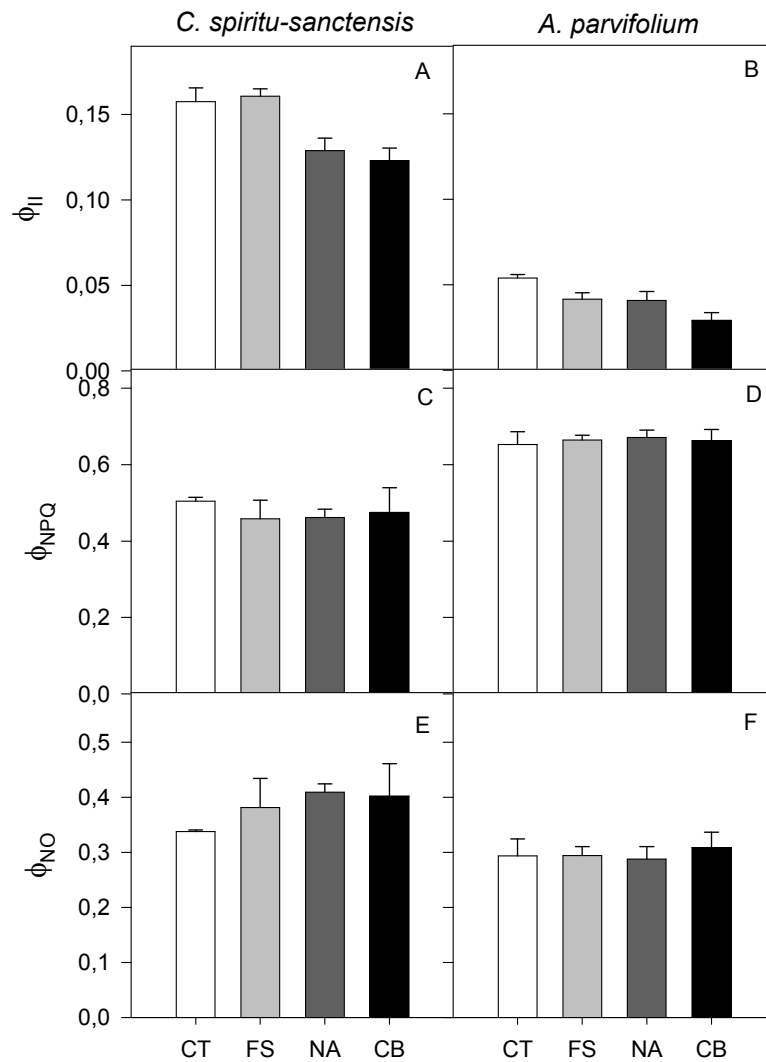


Figura 12: Alterações no rendimento quântico efetivo do PSII (ϕ_{II} ; A e B) e nos rendimentos quânticos de dissipação não-fotoquímica regulada (ϕ_{NPQ} ; C e D) e não-regulada (ϕ_{NO} ; E e F) em *Clusia spiritus-sanctensis* (painéis da esquerda) e *Aspidosperma parvifolium* (painéis da direita) em resposta a aplicação de neblina ácida simulada e MSP_{Fe} . Tratamento controle (CT), com deposição de MSP_{Fe} no solo (FS), com aplicação de neblina ácida simulada pH 3,0 (NA) e a combinação entre neblina ácida simulada e MSP_{Fe} no solo (CB).

Discussão

As imissões de poluentes atmosféricos por usinas de beneficiamento de minério de ferro podem afetar os diversos níveis de organização da vegetação vizinha, atingindo desde indivíduos isolados até populações inteiras de diversas espécies. Tal risco ambiental pode culminar na redução da biodiversidade local alterando a sucessão vegetacional. A deposição particulada pode afetar a vegetação através da deposição do

metal na superfície foliar ou no solo, alterando suas propriedades químicas e elevando a concentração de metais a níveis tóxicos para as plantas (Grantz *et al.*, 2003). As precipitações ácidas promovem o aumento da disponibilidade de elementos metálicos no solo e sua absorção pelas plantas (Neves *et al.*, 2009). Isso foi observado neste estudo, tendo sido encontrados maiores teores de ferro nas plantas expostas aos poluentes em campo e sob condições semi-controladas (Fig. 1 e Tab. 1). Acúmulo de Fe acima do nível crítico de toxidez ($500 \text{ mg kg}^{-1}_{\text{MS}}$; Marschner, 1995), entretanto, somente foi observado em plantas de *A. parvifolium* expostas aos poluentes no entorno da usina (Fig. 1). Nessas plantas os teores de S também alcançaram os mais altos valores. O SO_2 é prontamente absorvido pelos estômatos (Kaiser *et al.*, 1993) e, aparentemente, os maiores teores foliares de S em *A. parvifolium* se devem às diferenças no padrão diário de abertura estomática entre as espécies (CAM e C3). Em todos os experimentos realizados os teores foliares de S encontraram-se dentro do limite considerado normal para as plantas (0,1 a 0,5% do peso seco; Marschner, 1995).

A deposição de MP não ocorreu de maneira uniforme ao longo do ano, variando com a incidência de chuva, quantidade e intensidade de ventos, além da estrutura da planta (Fig. 1). A maior quantidade de MP presente em *C. spiritu-sanctensis* pode ser explicada em parte pela disposição das folhas (Fig. 1). Esta espécie apresenta filotaxia oposta e cruzada, além de folhas coriáceas espessas e de maior área. Tais características favorecem a deposição e a retenção do MP. *A. parvifolium*, por sua vez, mostra-se mais sujeita a ação de ventos e chuvas, devido à estrutura flexível dos ramos e de folhas menores e mais tenras.

A redução nos teores de N, Mg e Zn das folhas de *A. parvifolium* parece ter sido resultado da lixiviação desses nutrientes pela neblina ácida simulada (Evans *et al.*, 1981). A cutícula das folhas além de prevenir a perda de água pela transpiração, em grande parte, é responsável também por prevenir a lixiviação de nutrientes (Tukey, 1970, Shigihara *et al.*, 2008). Aparentemente, devido à espessa cutícula encontrada em *C. spiritu-sanctensis* a perda de nutrientes foliares não foi observada, mesmo após maior número de aplicações de neblina ácida simulada. A cutícula foliar é comumente erodida pelas precipitações ácidas (Shigihara *et al.*, 2008), conforme observado também nas espécies em estudo (Fig. 6 e 7).

Os maiores teores de P, Zn, Mn e Cu encontrados em *C. spiritu-sanctensis* em relação a *A. parvifolium* (Tab. 1) pode ser resultante do tipo de metabolismo fotossintético. Além do Cu e P, que participam no processo de transferência de elétrons

como componente da plastocianina e no metabolismo energético com formação de ATP, respectivamente, o Zn e o Mn desempenham funções importantes no metabolismo CAM. O Zn apresenta função catalítica na enzima anidrase carbônica. Alta atividade desta enzima é requerida para manter o equilíbrio entre CO_2 e HCO_3^- favorável à assimilação de HCO_3^- no metabolismo de plantas cuja enzima primária da fotossíntese é a fosfoenolpiruvato carboxilase (Burnell, 2000). O Mn participa ativamente no processo de transferência de elétrons no complexo de evolução do O_2 no PSII (Renger e Renger, 2008) e também é cofator da enzima NADP^+ málica responsável pela descarboxilação do malato em plantas CAM (Drincovich *et al.*, 2001).

O incremento no teor de clorofila das plantas sob exposição aos poluentes no campo ou em casa de vegetação pode ser indicativo da maior absorção do ferro, um dos constituintes principais de moléculas envolvidas na rota de síntese da clorofila (grupamentos *heme*). Os efeitos das precipitações ácidas sobre o teor de pigmentos, contudo, podem variar entre espécies ou devido ao pH das precipitações. Enquanto alguns trabalhos relatam redução (Fan e Wang, 2000), outros não registram mudanças (Smith *et al.*, 1991) ou, similarmente, incremento nos teores de clorofilas (Shan *et al.* 1995). A aplicação de MSP_{Fe} no solo acidificado com H_2SO_4 também não causou alterações significativas nos teores de pigmentos em *C. hilariana* (Pereira *et al.*, 2009).

Os maiores teores de pigmentos fotossintéticos encontrados em *C. spiritus-sanctensis* (Fig. 4 e Tab. 2) contribuíram com a maior eficiência de captura e utilização da energia luminosa (F_v/F_m , ϕ_{II} e q_p) por esta espécie em relação à *A. parvifolium* (Fig. 3, 11 e 12).

Em condições de campo, o que se observa de forma geral, para ambas as espécies, é a manutenção do rendimento quântico efetivo do PSII (ϕ_{II}), enquanto o rendimento quântico de dissipação regulada de energia (ϕ_{NPQ}) diminui e o rendimento quântico de dissipação não-regulada (ϕ_{NO}) aumenta (Fig. 3). A perda de eficiência na dissipação de energia de forma regulada pode levar a formação de espécies reativas de oxigênio, devido ao excesso de energia recebido e conseqüente formação de clorofila tripleto. Embora tais parâmetros (ϕ_{NPQ} e ϕ_{NO}) não tenham sido efetivamente alterados em resposta aos poluentes aplicados de maneira simulada em casa de vegetação (Fig. 12), houve significativa redução no *quenching* fotoquímico (q_p), na taxa aparente de transporte de elétrons no PSII (ETR; Fig. 11) e no ϕ_{II} (Fig. 12) para as duas espécies em decorrência dos tratamentos com neblina ácida simulada. Reduções significativas nos mesmos parâmetros foram relatadas por Velikova *et al.* (1999) em plantas de feijão

submetidas a uma única chuva ácida simulada com pH 1,8. Os autores sugerem que tais alterações ocorreram devido à penetração de íons no estroma, aumentando a acidez e consequentemente interferindo nos processos de formação de poder redutor e inibindo a atividade de enzimas do metabolismo de carbono.

De fato, em todas as condições experimentais e em ambas as espécies estudadas a taxa fotossintética líquida (A) foi o parâmetro mais sensível aos poluentes. Tanto em condições de campo ou em casa de vegetação houve reduções em A e na condutância estomática (g_s) das plantas em resposta à exposição aos poluentes (Fig. 2 e 10). Em plantas de *C. spiritu-sanctensis* expostas às emissões de MP e SO₂ próximo à usina a redução em A veio acompanhada de incremento na razão entre a concentração interna e externa de CO₂ (C_i/C_a), mesmo com baixo g_s . Tal fato indica que a fixação do CO₂ atmosférico pelas enzimas do metabolismo CAM apresentou limitações tanto estomáticas quanto não-estomáticas. O estresse provocado pelos mesmos poluentes em casa de vegetação foi menos severo nos parâmetros fotossintéticos em *C. spiritu-sanctensis*. Nessas condições, provavelmente as reduções em A , devem-se apenas ao início de limitações estomáticas, dadas pela suave redução nos valores de g_s ($p < 0,10$) nas plantas que receberam neblina ácida simulada. Já em *A. parvifolium* as limitações estomáticas à fixação de CO₂ tornam-se evidentes nas plantas expostas aos poluentes em casa de vegetação. A acentuada redução na condutância estomática ($p < 0,01$) juntamente com moderadas alterações em C_i/C_a , resultou na redução da taxa fotossintética líquida (Fig. 10). Outro fator capaz de prejudicar os processos fotossintéticos em plantas de restinga submetidas às precipitações ácidas são os danos estruturais nos estômatos (Silva *et al.*, 2005).

A presença de células-guarda flácidas e com cristas estomáticas rompidas, além de ostíolos obstruídos e danificados pode ter contribuído para a redução em g_s , notada principalmente em *A. parvifolium* (Fig. 7 e Fig. 10). As diferenças nas características da superfície foliar entre as duas espécies estudadas, principalmente na espessura da cutícula, interfere na retenção da precipitação ácida e consequentemente na penetração dos íons na lâmina foliar (Kerstiens, 1996, Silva *et al.*, 2005). Fato comprovado pelo rápido aparecimento de necroses e em maior quantidade em *A. parvifolium*, além da presença de rupturas na epiderme adaxial observadas apenas nessa espécie (Fig. 7-G). Assim como observado por Silva *et al.* (2005) em *Clusia hilariana*, os efeitos da precipitação ácida em *C. spiritu-sanctensis* provavelmente iniciaram-se a partir dos

estômatos, atingindo as células do parênquima lacunoso adjacentes à câmara subestomática.

Novamente as características da folha de cada espécie são fatores a serem considerados quanto à permeabilidade relativa de membrana. *A. parvifolium* mostrou-se mais sensível aos efeitos da deposição de MSP_{Fe} e SO_2 sobre o limbo foliar em condições de campo (Fig. 5). Provavelmente, a absorção de SO_2 pelos estômatos e a penetração de Fe nos tecidos foliares desta espécie, contribuíram para os maiores valores de extravasamento de eletrólitos, ocasionando desequilíbrio na homeostase de Fe, levando a formação de radicais livres e a um possível estresse oxidativo.

Seja com a exposição das plantas aos poluentes em condições de campo ou em casa de vegetação, *A. parvifolium* mostrou-se mais sensível. Dentre os diversos fatores que podem ter contribuído para as diferenças na intensidade das respostas entre as espécies, destacam-se principalmente as adaptações referentes ao metabolismo fotossintético em *C. spiritus-sanctensis*. Plantas CAM são especialmente equipadas para lidar com diversos estresses por meio de características anatômicas, morfológicas e fisiológicas, incluindo cutículas espessas, baixa relação superfície-volume, células e vacúolos grandes, com elevada capacidade de acúmulo de água (suculência) e redução do tamanho ou da frequência dos estômatos (Cushman, 2001) com poderoso e persistente controle do suprimento de CO_2 e água (Black e Osmond, 2003).

Entretanto, apesar das diferenças entre espécies, *C. spiritus-sanctensis* apresentou sintomas consideráveis em resposta aos poluentes. Considerando o importante papel ecológico de *Clusia* na restinga como planta facilitadora, quando severos, os danos causados a esta espécie pelos poluentes podem causar desequilíbrio na dinâmica sucessional nesse ambiente e comprometer o desenvolvimento de outras espécies.

Em ambas as espécies estudadas, dentre todas as avaliações, a taxa fotossintética foi o parâmetro mais efetivo na resposta das plantas aos poluentes, podendo ser empregado como biomarcador de risco ambiental em áreas expostas às deposições particuladas de minério de ferro e SO_2 .

Referências

Alves PLCA, Oliva MA, Cambraia J, Sant'Anna R. 1990. Efeito da chuva ácida simulada e de um solo de Cubatão-SP sobre parâmetros relacionados com a fotossíntese e a transpiração de plantas de soja. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 2, 7–14.

- Austin LG, Julianelli K, Souza AS, Schneider CL.** 2007. Simulation of wet ball milling of iron ore at Carajas, Brazil. *International Journal of Mineral Processing* **84**, 157–171.
- Becana M, Moran JF, 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.
- Black CC, Osmond CB.** 2003. Crassulacean acid metabolism photosynthesis: ‘working the night shift’. *Photosynthesis Research* **76**, 329–341.
- Burnell JN.** 2000. Carbonic anhydrases of higher plants: an overview. *EXS* **90**, 501–518.
- CONAMA.** 1990. **Resolução nº 3**, de 28 de junho; DOU, de 22 de agosto de 1990, Seção 1, páginas 15937–15939. Disponível em: <http://www.mpes.gov.br/>
- Cushman JC.** 2001. Crassulacean Acid Metabolism. A Plastic Photosynthetic Adaptation to Arid Environments. *Plant Physiology* **127**, 1439–1448.
- Drincovich M, Casati P, Andreo CS.** 2001. NADP-malic enzyme from plants: a ubiquitous enzyme involved in different metabolic pathways. *FEBS Letters* **490**, 1–6.
- Evans LS.** 1984. Botanical aspects of acidic precipitation. *Botanical Review* **50**, 449–490.
- Evans LS, Curry TM, Lewin KF.** 1981. Responses of leaves of *Phaseolus vulgaris* L. to simulated acidic rain. *New Phytologist* **88**, 403–420.
- Fan HB, Wang YH.** 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 JM, Baker NR.** 1989. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta* **990**, 87–92.
- Genty B, Harbinson J, Cailly AL, Rizza F.** 1996. *Fate of excitation at PS II in leaves: the non-photochemical side.* Presented at The Third BBSRC Robert Hill Symposium on Photosynthesis, March 31 to April 3, 1996, University of Sheffield, Department of Molecular Biology and Biotechnology, Western Bank, Sheffield, UK, Abstract no. P28
- Grantz DA, Garnerb JHB, Johnson DW.** 2003. Ecological effects of particulate matter. *Environment International* **29**: 213–239.
- Heath RL, Packer L.** 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplast. I. kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **125**, 189–198.
- Hell R, Stephan UW.** 2003. Iron uptake, trafficking and homeostasis in plants. *Planta* **216**, 541–551.
- Kaiser W, Dittrich A, Heber U.** 1993. Sulfate concentrations in Norway spruce needles in relation to atmospheric SO₂: a comparison of trees from various forests in Germany with trees fumigated with SO₂ in growth chambers. *Tree Physiology* **12**, 1–13.

- Kampfenkel K, Montagu MV, Inzé D.** 1995. Effects of Iron Excess on *Nicotiana plumbagnifolia* Plants: Implications to Oxidative Stress. *Plant Physiology* **107**, 725–735.
- Karnovsky MJ.** 1965. A formaldehyde – glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *Journal of Cellular Biology* **27**, 27–137.
- Kelly JM, Strickland RC.** 1986. Through fall and plant nutrient concentration response to simulated acid rain treatment. *Water, Air and Soil Pollution* **29**, 219–231.
- Kerstiens G.** 1996. Signalling across the divide: a wider perspective of cuticular structure–function relationships. *Trends in Plant Science* **1**, 125–129.
- Kitajima M, Buter WL.** 1975. Quenching of chlorophyll fluorescence and primary photochemistry in chloroplasts by dibromothymoquinone. *Biochimica et Biophysica Acta* **376**, 105–115.
- Köppen WP.** 1918. *Klassifikation der Klimate nach Temperatur*. Niederschlag und Jahreslauf. Petermanns Geog. Mitt. 64. p.243–248.
- Kuki KN, Oliva MA, Pereira EG** (2008a) Iron Ore Industry Emissions as a Potential Ecological Risk Factor for Tropical Coastal Vegetation. *Environmental Management* **42**, 111–121.
- Kuki KN, Oliva MA, Pereira EG, Costa AC, 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.
- Lee Y, Park J, Im K, Kim K, Lee J, Lee K, Park J, Lee T, Park D, Yang J, Kim D e Lee S.** 2006. Arabidopsis leaf necrosis caused by simulated acid rain is related to the salicylic acid signaling pathway. *Plant Physiology and Biochemistry* **44**, 38–42.
- Liebig M, Scarano FR, Mattos de EA, Zaluar HLT, Lüttge U.** 2001. Ecophysiological and floristic implications of sex expression in the dioecious neotropical CAM tree *Clusia hilariana* Schltdl. *Trees* **15**, 278–288.
- Lopes SA, Oliva MA, Martinez CA** (2000) *Impacto das imissões de dióxido de enxofre e deposição de material particulado de ferro em espécies vegetais de restinga: avaliação ecofisiológica*. In: Espíndola E., Paschoal C, Rocha O, Bohrer M, Oliveira Neto A (eds). **Ecotoxicologia**. RiMa Artes e Textos, São Carlos, pp.53–71.
- Lüttge U.** 2004. Ecophysiology of crassulacean acid metabolism (CAM). *Annals of Botany* **93**, 629–652.
- Lüttge U.** 2006. Photosynthetic flexibility and ecophysiological plasticity: questions and lessons from *Clusia*, the only CAM tree, in the neotropics. *New Phytologist* **171**, 7–25.
- MacCann JH, Solomon KR.** 2000. The Effect of creosote on membrane ion leakage in *Myriophyllum spicatum* L. *Aquatic Toxicology* **50**, 274–284.
- Malavolta E, Vitti GC, Oliveira SA.** 1997. *Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações*. 2 ed. Piracicaba, SP: Potafos. 319 p.
- Marschner H** 1995. *Mineral nutrition of higher plants*. Academic Press, London. Second ed. 889p.

- Melis A, Spangfort M, Andersson B.** 1987. Light-absorption and electron-transport balance between photosystem II and photosystem I in spinach chloroplasts. *Photochemistry and Photobiology* **45**, 129–136.
- Neves NR, Oliva MA, Centeno DC, Costa AC, Ribas RF, Pereira EG.** 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.
- Oxborough K, Baker NR.** 1997. Resolving chlorophyll *a* fluorescence images of photosynthetic efficiency into photochemical and non-photochemical components – calculation of q_p and F_v'/F_m' without measuring F_0' . *Photosynthesis Research* **54**, 135–142.
- Pereira EG.** 2006. *Efeitos fisiológicos e bioquímicos causados pela deposição de ferro particulado em Clusia hilariana, uma espécie de restinga*. Tese de mestrado em Fisiologia Vegetal, UFV, 54 pg.
- Pereira EG, Oliva MA, Kuki KN, 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.
- Pereira MCA, Cordeiro SZ, Araujo DSD.** 2004. Estrutura do estrato herbáceo na formação aberta de *Clusia* do Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba, RJ, Brasil. *Acta Botânica Brasilica* **18**, 677–687.
- Renger G, Renger T.** 2008. Photosystem II: The machinery of photosynthetic water splitting. *Photosynthesis Research* **98**, 53–80.
- Scarano FR.** 2002. Structure, function and floristic relationships of plants communities in stressful habitats marginal to Brazilian Atlantic Rainforest. *Annals of Botany* **90**, 517–524.
- Shan Y, Feng Z, Izuta T, Aoki M, Totsuka T.** 1995. The individual and combined effects of ozone and simulated acid-rain on chlorophyll contents, carbon allocation and biomass accumulation of armand pine seedlings. *Water, Air and Soil Pollution* **85**, 1399–1404.
- Shigihara A, Matsumoto K, Sakurai N, Igawa M.** 2008. Leaching of cell wall components caused by acid deposition on fir needles and trees. *Science of the Total Environment* **398**, 185–195.
- Silva LC, Oliva MA, Azevedo AA, Araújo JM e Aguiar RM.** 2005. Micromorphological and anatomical alterations caused by simulated acid rain in restinga plants: *Eugenia uniflora* and *Clusia hilariana*. *Water, Air, and Soil Pollution* **168**, 129–143.
- Silva LC, Oliva MA, Azevedo AA, Araújo JM.** 2006. Responses of resting plant species to pollution from an iron pelletization factory. *Water, Air and Soil Pollution* **175**, 241–256.
- Smith CR, Vasilas BL, Banwart WL, Walker WM.** 1991. Physiological response of two soybean cultivars to simulated acid rain. *New Phytologist* **119**, 53–60.
- Tarhanen S, Metsärinne S, Holopainen T, Oksanen J.** 1999. Membrane permeability response of lichen *Bryoria fuscescens* to wet deposited heavy metals and acid rain. *Environmental Pollution* **104**, 121–129.

Taylor GJ, Crowder AA. 1983. Use of the DCB technique for extraction of hydrous iron oxides from roots of wetland plants. *American Journal of Botany* **70**, 1254–1257

Tukey HB. 1970. The leaching of substances from plants. *Annual Review of Plant Physiology* **21**, 305–324.

Velikova V, Tsonev T, Yordanov I. 1999. Light and CO₂ responses of photosynthesis and chlorophyll fluorescence characteristics in bean plants after simulated acid rain. *Physiologia Plantarum* **107**, 77–83.

Wellburn, AR. 1994. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrometers of different resolution. *Journal of Plant Physiology* **144**, 307–313.

Zaluar HLT, Scarano FR. 2000. *Facilitação em restingas de moitas: um século de buscas por espécies focais*. In: Esteves FA, Lacerda LD (eds). **Ecologia de Restingas e Lagoas Costeiras**. NUPEM-UFRJ, Rio de Janeiro, pp 1–21.

5. CONCLUSÕES GERAIS

Os efeitos tóxicos do ferro sobre as plantas englobam vários aspectos fisiológicos distintos, dependendo da forma com que o estresse é imposto.

O aumento na disponibilidade do ferro na solução de cultivo, como ocorre em solos alagados onde o arroz é comumente cultivado, elevou a concentração deste metal a níveis tóxicos nos tecidos de diversos genótipos. Entretanto, existiram diferentes respostas entre os diferentes genótipos estudados, como consequência da magnitude do acúmulo de ferro. Com o uso de metodologias não invasivas foi possível detectar redução no teor de pigmentos, diminuição da fotossíntese líquida, aumento da fotorrespiração e alterações nos parâmetros de fluorescência da clorofila *a*, principalmente nos genótipos mais sensíveis ao excesso de ferro. Os efeitos sobre a fotossíntese devem-se principalmente a componentes estomáticos e consequentemente a componentes não-estomáticos, provavelmente em resposta ao estresse oxidativo gerado.

O estresse por excesso de ferro também pode ser resultado de sua precipitação sobre as raízes das plantas formando a chamada placa de ferro. Com aumento no tempo de exposição e intensidade de formação da placa de ferro, a absorção de outros nutrientes pela planta foi alterada. Observou-se reduções significativas nos conteúdos de P, Mg e Mn nas folhas de diferentes genótipos de arroz. Os genótipos provenientes de cultivos em terras altas apresentaram menor intensidade na formação da placa. A placa de ferro depositou-se principalmente externamente à exoderme, com excessão do genótipo Canastra em que o ferro foi histolocalizado também no córtex radicular. A formação da placa não causou alterações significativas em nenhuma variável de fluorescência da clorofila *a*. As diversas diferenças encontradas entre os genótipos provavelmente estão relacionadas à seletividade da exoderme, poder oxidativo das raízes e a mecanismos nutricionais.

Eventos antrópicos relacionados à poluição atmosférica também podem elevar o nível de ferro nos solos. A deposição do material sólido particulado de ferro e dióxido de enxofre causou reduções em diversos parâmetros fotossintéticos em *Clusia spiritusanctensis* e *Aspidosperma parvifolium*. Esta última espécie apresentando os sintomas mais severos, juntamente com maior acúmulo de ferro e enxofre nos tecidos. Sob condições de campo, a exposição das plantas ao MSP_{Fe} e SO_2 causou reduções significativas na taxa fotossintética, desequilíbrio nos processo de captura e utilização da energia luminosa e dano às membranas celulares principalmente em *A. parvifolium*.

O aparecimento de necroses na superfície foliar em decorrência da aplicação simulada de neblina ácida e MSP_{Fe} foram observados primeiramente em *A. parvifolium*. Foi observado escamação de cera epicuticular e estômatos danificados nas duas espécies. O ferro foi histolocalizado principalmente no floema e epiderme foliar. A aplicação da neblina ácida simulada causou reduções na taxa fotossintética, na eficiência quântica máxima do fotossistema II, na taxa de transporte de elétrons e no *quenching* fotoquímico. Em *A. parvifolium* foram observadas reduções no teor foliar de N, Mg e Zn. As diferenças na resposta das plantas aos poluentes podem ser associadas com as adaptações morfo-anatômicas e fisiológicas inerentes ao metabolismo CAM em *C. spiritus-sanctensis*. Entretanto, os sintomas observados nesta espécie foram consideráveis. Dado seu importante papel ecológico na restinga como planta facilitadora, as emissões dos poluentes por fontes mineradoras podem causar desequilíbrio na dinâmica sucessional da restinga e comprometer o desenvolvimento de outras espécies vegetais.