

MARTIELLY SANTANA DOS SANTOS

**O PAPEL DO SILÍCIO NA REDUÇÃO DOS IMPACTOS DA TOXIDEZ DE  
FERRO EM ARROZ: UMA ABORDAGEM MORFOANATÔMICA E  
FISIOLÓGICA**

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  
2017

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

S237p  
2017 Santos, Martielly Santana dos, 1988-  
O papel do silício na redução dos impactos da toxidez de  
ferro em arroz : uma abordagem morfoanatômica e fisiológica /  
Martielly Santana dos Santos. – Viçosa, MG, 2017.  
xi, 115f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: Fábio Murilo da Matta.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. *Oryza sativa*. 2. Arroz. 3. Silício. 4. Ferro.  
5. Fotossíntese. I. Universidade Federal de Viçosa.  
Departamento de Biologia Vegetal. Programa de Pós-graduação  
em Fisiologia Vegetal. II. Título.

CDD 22 ed. 633.18

MARTIELLY SANTANA DOS SANTOS

**O PAPEL DO SILÍCIO NA REDUÇÃO DOS IMPACTOS DA TOXIDEZ DE  
FERRO EM ARROZ: UMA ABORDAGEM MORFOANATÔMICA E  
FISIOLÓGICA**

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: 04 de maio de 2017.

---

Leandro Elias Morais

---

Juraci Alves de Oliveira

---

Carla Quinhones Godoy Soares

---

Aristéa Alves Azevedo

---

Fábio Murilo DaMatta  
(Orientador)

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida maravilhosa e cheia de oportunidades que me concedeu, e, apesar de ser uma filha que o questiona sempre, Ele nunca deixou de existir no meu coração.

Aos meus pais, Maria das Graças e José Roberto, e minha irmã, Francielle, pelo amor incondicional, apoio, cuidado e ensinamentos. Tudo que faço é por vocês.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV), e em especial ao Programa de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal, pela oportunidade de crescimento profissional; e ao CNPq, pela concessão da bolsa que possibilitou a realização da pesquisa.

Ao meu orientador, Fábio DaMatta, que, com carinho, cuidado, paciência e atenção, guiou-me com seus ensinamentos durante o desenvolvimento da pesquisa. Sou grata por possibilitar todo o aprendizado teórico e prático que tive sob sua orientação, e, ao final, por segurar minha mão rumo à defesa.

À minha Coorientadora, Aristéa Azevedo, pelo carinho, entusiasmo, ensinamentos transmitidos e orientações constantes.

A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal da UFV, com os quais aprendi muito: Prof Raimundo (pelos cafés Tabatânicos), Adriano Nunes-Nesi, Wagner Araújo, Juraci, Marcelo Rogalski, Dimas. Agradeço a todos vocês não apenas pelos ensinamentos, mas pelo carinho e preocupação em fazer sempre o melhor.

Aos professores de Fisiologia Vegetal da UESC, Fábio Gomes e Marcelo Mielke, que mudaram a minha vida ao ensinar, ainda na graduação, sobre a máquina biológica que move a vida na Terra (as plantas). Escolhi ser fisiologista vegetal pelas aulas excelentes desses profissionais. Assim, sou prova viva que um professor pode mudar vidas;

Às minhas mães-acadêmicas, Larissa Costa e Delmira Silva, que me orientaram na graduação e mestrado, ensinando muito do que sou hoje como profissional e pessoa;

Ao grupo arroz/café do Laboratório de Nutrição e Metabolismo de Plantas da UFV: Alicinha, Alyne (Bahia), Kelly, Marcela, Amanda, Dinorah, Leandro Elias, Paulo, Wellington, Kleiton, Marco Antônio e Willian Gonzaga, pelo carinho, amizades e muito trabalho que realizamos em conjunto. Em especial, agradeço a Lílian Sanglard, que me ensinou muito sobre as práticas laboratoriais: posso dizer que você não somente ajudou no meu experimento, mas viveu junto comigo cada alegria e dificuldade, e após as perdas de experimentos, aprendi com ela a frase: “Não se abale, Marty!”; Ao Danilo César por ajudar na contagem infinita dos grãos. Por fim, na

equipe agradeço ainda a três pessoas que foram amigos além dos corredores do laboratório: Rodrigo, que, apesar de suas loucuras (rsrsr), deu-me os mais sábios conselhos quando acreditei que nada tinha sentido. Ao meu irmãozinho Junior Pastor, por todo carinho, atenção, inúmeros conselhos e paciência infinita, e claro... por todo o sushi que comemos ao longo desses 4 anos. E ao doce e amado amigo Rafa Mauri, por ser luz no meu caminho e despertar em mim os melhores sentimentos. Nossa amizade é de outra vida.

Aos amigos da anatomia vegetal: Aurora (Aurorinha), Patrícia, Isabel, Ivanilson (Xico), Ivan e Katiúscia, por todos os ensinamentos e amizade dados a uma agregada da fisiologia (“euzinha”).

Ao Prof<sup>o</sup> Samuel Cordeiro (Samuca), por todos os ensinamentos sobre  $g_m$  e por todos os questionamentos que sempre me fizeram pensar mais. Samuca, uma pessoa iluminada e um exemplo a ser seguido!!

Agradeço as minhas amigas da República ‘Só Nordeste’: Valéria (Val), que deu seu sangue, literalmente, nas coletas de anatomia. Val, que por muitas vezes foi minha razão por meio de conselhos sábios e me ensinou muito do que sou hoje. A Luana, que foi um anjo na minha vida e que no momento em que vi meus sonhos serem destruídos e decidi assassinar os que sobraram, foi meu porto seguro e me ensinou a ter novos sonhos. Como escrevi uma vez para você: No meu mar de insanidade, você foi o farol que me conduziu a terra firme. Essa defesa é graças a você. Te amo Lu. Agradeço também a Marinalva, Caroline e, especialmente, a Luciana (Pretinha), pelos momentos de descontração regados de muita alegria, risadas, comidas e coreografias. Luci, você deixou meus dias mais leves e felizes.

Aos meus amigos da Bahia, Patrícia Casaes, Priscila Souza, Tessio Santana, Léo Dias que, mesmo com a distância e o tempo, estiveram ao meu “lado” através de ligações e mensagens. Vocês iluminam a minha vida.

Aos meus amigos da Fisiologia, Daniele Brito, Roberto Neri, Elias Feitosa, Auxiliadora (Dora), Amandinha, Greice, Danúbia, Priscila, Carolina, Alice Carvalho, Carla Bastos, Carla Quinhones e Fagner, pela amizade, carinho, risos e palavras positivas e animadoras durante a minha trajetória em Viçosa.

A secretária Luciene, por receber todos os estudantes com carinho, competência e atenção na resolução de nossos problemas burocráticos.

Ao laboratorista Itamar, pelo apoio, carinho e amizade, construída junto com as infinitas análises nutricionais.

Ao Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV, representado pelos seus técnicos Gilmar, Carla e Carlota, sou grata pelas realizações de análises envolvendo microscopia eletrônica (MEV e EDS);

Ao Instituto Rio Grandense do Arroz (IRGA) e a EPAGRI, pelo envio das sementes que foram utilizadas na pesquisa.

Enfim, a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para o meu crescimento pessoal e profissional. Não teria conseguido sem vocês. OBRIGADA!!

## ÍNDICE

Resumo.....	viii
Abstract .....	x
<b>Introdução Geral</b> .....	1
<b>Referências</b> .....	6
<b>Capítulo I - O silício atenua a toxidez de ferro em arroz preservando a capacidade fotossintética via ajustes na condutância foliar, e com impactos mínimos no metabolismo do carbono.</b>	
<b>Resumo</b> .....	11
<b>1.Introdução</b> .....	12
<b>2. Materiais e Métodos</b> .....	15
2.1 Condições de cultivo e imposição dos tratamentos.....	15
2.2 Quantificação do Si e Fe em folhas e raízes.....	16
2.3 Medições de trocas gasosas foliares e a análise das limitações à fotossíntese	16
2.4 Metabólitos .....	17
2.5 Atividades enzimáticas .....	18
2.6 Proteínas solúveis e pigmentos.....	18
2.7 Análise estatística .....	18
<b>3. Resultados</b> .....	20
3.1 O Si reduz a concentração de Fe, especialmente na parte aérea.....	20
3.2 O Si reverte parcialmente os efeitos negativos do excesso de Fe sobre as taxas fotossintéticas, fundamentalmente por impactar a condutância difusiva foliar, com alterações mínimas na capacidade fotoquímica e bioquímica.....	21
3.3 Limitações à fotossíntese são impactadas pelo Si/Fe.....	25
3.4 O metabolismo do carbono foi minimamente alterado pelos tratamentos aplicados.....	27
<b>4. Discussão</b> .....	32
<b>Referências</b> .....	35

Anexo I- Dados suplementares .....	40
------------------------------------	----

## **Capítulo II-** O papel do silício na toxidez por Fe em arroz: uma abordagem morfoanatômica.

<b>Resumo</b> .....	45
<b>1.Introdução</b> .....	46
<b>2. Materiais e Métodos</b> .....	49
2.1 Condições de cultivo e imposição dos tratamentos.....	49
2.2 Quantificação do Si e Fe em folhas e raízes.....	50
2.3 Extração e determinação da placa de Fe da superfície radicular .....	50
2.4 Morfologia da raiz.....	50
2.5 Análise anatômica e histoquímica de folhas e raízes.....	51
2.6 Microscopia eletrônica de varredura e espectrometria de energia dispersiva de raio-x (EDS) .....	51
2.7 Enzimas do sistema antioxidante e danos oxidativos em folhas e raízes.....	52
2.8 Extração de mRNA, síntese de cDNA e PCR em tempo real (qPCR) .....	52
2.9 Análise estatística.....	53
<b>3. Resultados</b> .....	55
3.1 Si reduz o teor de Fe na parte aérea por afetar FT e FBC.....	55
3.2 Si reduz a formação da placa de Fe no sistema radicular.....	58
3.3 O Fe afeta a anatomia da raiz, mas sem grandes impactos na folha.....	63
3.4 Parede celular é a barreira na redução da absorção e translocação de Fe em raízes e folhas.....	67
3.5 Atividade antioxidante é aumentada pelo Fe, mas sem efeito do Si.....	70
3.6 A expressão de genes envolvidos no transporte e armazenamento de Fe são afetados pelo Si.....	71
<b>Discussão</b> .....	73
<b>Referências</b> .....	76
Anexo II- Dados suplementares .....	81

## **Capítulo III -** A fertilização com Si potencializa a produtividade em arroz mesmo em condições de toxidez por Fe.

<b>Resumo</b> .....	86
---------------------	----

<b>1.Introdução</b> .....	87
<b>2. Materiais e Métodos</b> .....	90
2.1 Condições de cultivo e imposição dos tratamentos.....	90
2.2 Quantificação do Si e Fe em folhas e raízes.....	91
2.3 Composição mineral das folhas, raízes e grãos.....	91
2.4 Medições de trocas gasosas foliares e a análise das limitações à fotossíntese.....	91
2.5 Crescimento e produtividade.....	92
2.5 Análise estatística.....	92
<b>3.Resultados</b> .....	94
3.1 O Si reduz o teor de Fe em folhas e raízes, mas sem afetar o seu teor nos grãos.....	94
3.2 O excesso de Fe afetou especialmente a composição mineral das folhas, fato parcialmente revertido pelo Si.....	96
3.3 Os impactos negativos do Fe sobre a fotossíntese e produtividade são mitigados pelo Si.....	98
<b>4. Discussão</b> .....	105
<b>Referências</b> .....	108
Anexo III -Dados suplementares.....	112
<b>Conclusão Geral</b> .....	114

## RESUMO

SANTOS, Martielly Santana, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, maio de 2017. **O papel do silício na redução dos impactos da toxidez de ferro em arroz: uma abordagem morfoanatômica e fisiológica.** Orientador: Fábio Murilo da Matta.

A toxidez por excesso de ferro (Fe) é uma das mais importantes desordens nutricionais que afetam processos vitais como respiração e fotossíntese, acarretando reduções no crescimento e na produção de arroz. A nutrição com silício (Si) tem-se revelado como uma alternativa promissora na mitigação de fatores de estresse abióticos, tal como metais tóxicos. Informações preliminares sugerem que o Si pode também mitigar os efeitos da toxidez de Fe em arroz, mas não se conhecem os mecanismos envolvidos nesse contexto. Diante disso, o presente trabalho objetivou determinar o potencial mitigatório do Si sobre a toxidez por Fe em arroz, por meio de caracterização detalhada dos aspectos fotossintéticos, bioquímicos, morfofisiológicos e de produtividade. Para isso, dois experimentos independentes foram montados e analisados como tal (o primeiro com plantas no estágio vegetativo; o segundo, até o fim do estágio reprodutivo) utilizando duas cultivares com respostas contrastantes para excesso de Fe (EPAGRI-109 e BR-IRGA-409, tolerante e sensível a toxidez, respectivamente). As plantas foram cultivadas em solução nutritiva não-aerada e suplementadas com Si (0 e 2 mmol L<sup>-1</sup>) e Fe (25 µmol L<sup>-1</sup> e 5 mmol L<sup>-1</sup>). No estágio vegetativo, a toxidez por Fe impactou negativamente a taxa fotossintética líquida (A) ao reduzir as condutâncias estomática (g<sub>s</sub>) e mesofílica (g<sub>m</sub>), além de aumentar a fotorrespiração em ambas as cultivares. Além disso, alterações na arquitetura radicular e na anatomia foram correlacionados com maiores teores de Fe. Por outro lado, a fertilização com Si atenuou tais efeitos da toxidez ao reduzir o teor de Fe em folhas e raízes, o que se refletiu em menores fatores de translocação e de bioconcentração, particularmente na cultivar sensível. Reduções nos teores de Fe favoreceram aumento em A por reduzir as limitações difusionais à fotossíntese, com aumentos correspondentes em g<sub>s</sub> e g<sub>m</sub>. Registre-se que os parâmetros fotoquímicos e bioquímicos da fotossíntese, bem como a atividade das enzimas do metabolismo do carbono, foram minimamente afetados pelos tratamentos com Si/Fe. Saliente-se ainda que alterações nos fatores de translocação e de bioconcentração foram associadas ao decréscimo na expressão dos genes que codificam para os transportadores de Fe (IRT1 e IRT2), bem como a maior retenção do Fe nas paredes celulares da exoderme e endoderme na raiz, e em células parenquimáticas do xilema em folhas. Além disso, a redução da placa de Fe nas cultivares +Si+Fe foi relacionada, aparentemente, ao espessamento da parede celular

da faixa esclerenquimática da raiz. Nos experimentos conduzidos na fase reprodutiva, a toxidez por Fe promoveu variações expressivas nos teores de alguns nutrientes, especialmente Ca e Mg nas folhas, fato parcialmente revertido pelo Si, porém com alterações mínimas na composição nutricional dos grãos. A toxidez por Fe acarretou decréscimos em A em paralelo a reduções em  $g_s$  e na taxa de transporte de elétrons (ETR), em especial na cultivar sensível. Contudo, tais respostas foram revertidas parcialmente em ambas as cultivares pela aplicação de Si. O menor acúmulo de Fe nas plantas +Si foi associado ao maior rendimento de grãos, suportado pelo aumento em A acoplado ao incremento em  $g_s$  e ETR. Além disso, os resultados sugerem que o Si tenha reduzido o impacto negativo do Fe sobre a esterilidade das espiguetas. Em síntese, recomenda-se o emprego do Si como uma estratégia de manejo efetiva para reduzir os impactos negativos da toxidez por Fe sobre o desempenho fotossintético e a produção de grãos em arroz.

## ABSTRACT

SANTOS, Martielly Santana, D.Sc., University Federal de Viçosa, May, 2017. **The role of silicon in reducing the impacts of iron toxicity on rice: a morpho-anatomical and physiological approach.** Adviser: Fábio Murilo DaMatta.

Iron toxicity (Fe) is one of the most important nutritional disorders that affects vital processes such as respiration and photosynthesis, resulting in reductions on rice growth and production. Silicon (Si) nutrition has emerged as a promising alternative in mitigating a range of stressful conditions including metal toxicity. Some information suggests that Si can also mitigate the effects of Fe toxicity on rice, although the underlying mechanisms are still poorly understood. This study aimed at assessing the potential role of Si on Fe toxicity, by means of a detailed characterization of the photosynthetic, biochemical, morphophysiological and yield traits in rice plants. To reach these goals, two independent experiments were performed (vegetative and reproductive stage) using two contrasting cultivars in terms of tolerance to excess Fe (EPAGRI-109 and BR-IRGA-409, tolerant and sensitive to Fe toxicity, respectively). The plants were grown in non-aerated nutrition solutions with two Si (0 and 2 mmol L<sup>-1</sup>) and two Fe (25 µmol L<sup>-1</sup> and 5 mmol L<sup>-1</sup>) doses. In the vegetative stage, Fe toxicity negatively impacted the photosynthetic rates (A) by reducing stomatal (g<sub>s</sub>) and mesophyll (g<sub>m</sub>) conductances, as well as by increasing photorespiration rates in both cultivars. In addition, changes in root architecture and anatomy were correlated with higher levels of Fe. On the other hand, fertilization with Si attenuated these negative effects of toxicity by reducing Fe content in leaves and roots, which indirectly helped to maintain A via preservation of diffusion aspects, as inferred from the partial maintenance of g<sub>s</sub> and g<sub>m</sub>. Notably, the photochemical and biochemical parameters of photosynthesis, as well as the enzymes of the carbon metabolism, were minimally affected by the treatments. It was also emphasized that Si fertilization reduced the Fe content in roots and leaves of both cultivars, which was associated with lower translocation and bioconcentration factors, particularly in the sensitive cultivar to excess Fe. Such responses were associated with decreased expression of genes encoding the Fe transporters (IRT1 and IRT2), as well as increased Fe retention on the root sclerenchyma and endoderm cell walls, and leaf xylem parenchyma cells. In addition, the reduction of Fe plaque formation in the cultivars +Si+Fe was related to the apparent cell wall thickening of root sclerenchyma. At the reproductive stage, Fe toxicity promoted significant variations in the Ca and Mg contents in leaves, which were minimized by Si additions, but with minimal changes in grain nutritional

composition. Fe toxicity resulted in decreases in A in parallel to reductions in  $g_s$  and electron transport rate (ETR), especially in the sensitive cultivar. However, such responses were partially reversed in both cultivars by the application of Si. The lowest Fe accumulation in plants +Si was associated with higher grain yield, supported by increased A coupled with concordant increments in both  $g_s$  and ETR. Furthermore, the results suggest that Si reduced the negative impact of Fe toxicity on sterility of the spikelets. In summary, it is concluded that the use of Si is an effective management strategy to reduce the negative impacts of Fe toxicity on the photosynthetic performance and the grain yields in rice.

## INTRODUÇÃO GERAL

O ferro (Fe) é um micronutriente essencial às plantas, uma vez que inúmeras reações metabólicas vitais dependem desse elemento (Jain e Connolly, 2013). Todavia, sua biodisponibilidade no solo é reduzida, o que levou as plantas, evolutivamente, a maximizarem a absorção de Fe mediante duas estratégias distintas (Ricachenevsky e Sperotto, 2014). A estratégia I, presente na maioria das plantas, baseia-se na redução do Fe da forma férrica ( $\text{Fe}^{3+}$ ) para a ferrosa ( $\text{Fe}^{2+}$ ), via acidificação do meio pela extrusão de prótons pelas células epidérmicas radiculares (Bashir et al, 2011). A estratégia II, por seu turno, comum em gramíneas, reside na absorção de  $\text{Fe}^{3+}$  via secreção e complexação com compostos orgânicos, denominados fitosideróforos (Ricachenevsky et al, 2011). No arroz, a absorção é feita usando-se as estratégias I e II, isoladamente ou combinadas, ou seja, a absorção de  $\text{Fe}^{2+}$  e/ou  $\text{Fe}^{3+}$  dependerá da sua disponibilidade no solo (Sperotto et al, 2012; Ricachenevsky e Sperotto, 2014).

Na célula, mitocôndrias e cloroplastos desempenham papel central no metabolismo e na homeostase de Fe (Briat et al, 2007), uma vez que esse metal é cofator essencial para várias proteínas envolvidas na cadeia transportadora de elétrons da fotossíntese e da respiração (Bashir et al, 2011; Thomine e Vert, 2013). Porém, em excesso, o Fe pode causar alterações na taxa respiratória (Vigani et al, 2013), provocar danos oxidativos (Stein et al, 2009; Stein et al, 2014), deficiência nutricional e baixo desempenho fotossintético, fato normalmente acompanhado de fotoinibição da fotossíntese (Pereira et al, 2013; Müller et al, 2015), o acarreta perdas de produtividade das culturas, como no arroz.

Apesar da importância metabólica do Fe e das diferentes estratégias de absorção pelas plantas, a biodisponibilidade desse metal em ambiente aeróbio é baixa, o que leva a maioria das espécies a apresentar sintomas de deficiência (Sperotto et al, 2010). Contudo, em arroz de cultivo alagado o cenário é diferente, pois nas condições de anaerobiose e baixo pH uma elevada quantidade de Fe na forma reduzida ( $\text{Fe}^{2+}$ ) é liberada na solução do solo, podendo atingir níveis de toxidez prejudiciais à cultura. Perdas de rendimento em arroz sob toxidez por Fe, geralmente, variam de 40-45% do rendimento total, dependendo da cultivar, do tempo, intensidade do estresse e da estratégia de manejo utilizada (e.g. fertilização mineral) (Audebert e Fofana, 2009).

A toxidez por Fe acarreta um desbalanço iônico, evidenciado por uma desordem nutricional, com redução na absorção de P, K, Ca e Mg (Müller et al, 2015;

Pereira et al, 2013), sendo observados sintomas como bronzeamento da região apical das folhas mais velhas e necrose (Audebert e Fofana, 2009), redução no crescimento, escurecimento de raízes e formação da placa de ferro na superfície desse órgão (Santana et al, 2014). Em nível anatômico, são observadas as seguintes alterações: redução nas células da epiderme e do mesofilo foliar (Müller et al, 2015), colapso do córtex radicular, incluindo a endoderme (Santana et al, 2014), ruptura da membrana plasmática, devido a peroxidação lipídica, deformação na parede celular (You-Qiang et al, 2012), redução no tamanho e número dos grana dos tilacóides (Platt-Aloia et al, 1983), além de rompimento do tonoplasto (Zhang et al, 2011). Tais danos são, normalmente, provocados pelas espécies reativas de oxigênio (ROS) e são minimizados nas plantas pela ação de um sistema antioxidante, composto por mecanismos enzimáticos (e.g., incluindo dismutases do superóxido (SOD), redutase da glutatona (GR) e peroxidase do ascorbato (APX)) e não enzimáticos (e.g., ascorbato e glutatona) (Stein et al, 2009; Stein et al, 2014). Além das estratégias antioxidantes, o armazenamento do Fe no vacúolo e sua compartimentalização em proteínas cloroplastídicas e mitocondriais, como as ferritinas, representam mecanismos importantes de detoxificação do Fe na célula. As ferritinas, por exemplo, são capazes de armazenar até 4500 átomos de Fe na sua cavidade protéica, e o aumento na expressão gênica das ferritinas (FER1 e FER2) em plantas de arroz sob excesso de Fe demonstra a importância dessa proteína no controle da homeostase do Fe (Briat et al, 2007; Stein et al, 2009, Silveira et al, 2009).

A disponibilidade de Fe no tecido foliar impacta direta ou indiretamente o processo fotossintético. Adamski et al (2012), avaliando os efeitos do excesso de Fe em *Ipomoea*, demonstraram a diminuição na eficiência do fotossistema II (FSII), com consequente mudança no direcionamento da energia fotoquímica por meio da dissipação de energia. Resultados semelhantes foram obtidos em arroz, em que o excesso de Fe ( $7 \text{ mmol L}^{-1}$ ) acarretou diminuição na eficiência fotoquímica máxima do PSII ( $F_v/F_m$ ), fato associado com o aumento dos níveis da fluorescência inicial ( $F_0$ ), sugerindo fotoinativação do PSII ou fotooxidação (Pereira et al, 2013). Ademais, os decréscimos na taxa fotossintética líquida ( $A$ ), em cultivares de arroz sob excesso de Fe, foram atribuídos a limitações estomáticas e não-estomáticas (Pereira et al, 2013). Contudo, além da condutância estomática ( $g_s$ ), a capacidade fotossintética é influenciada pela condutância mesofílica ( $g_m$ ), a qual está relacionada à difusão do  $\text{CO}_2$ , nos espaços intercelulares até os sítios de carboxilação no estroma dos

cloroplastos (Flexas et al, 2012). Apesar de não haver informações sobre os efeitos da toxidez por Fe em  $g_m$ , o comportamento dessa variável sob estresses causados por metais tóxicos vem sendo relatada. Velikova et al. (2011) ao investigarem a toxidez por níquel (Ni), em *Populus nigra*, atribuíram à  $g_m$  o principal fator de limitação fotossintética. Em contraste, os impactos da toxidez de zinco na fotossíntese de *Beta vulgaris* foram atribuídos mais à redução de  $g_s$  do que de  $g_m$ , sem ocorrer limitação bioquímica (Sagardoy et al, 2010). De fato, metais pesados alteram os aspectos fisiológicos em maior ou menor grau, a depender da tolerância da cultivar e do tempo de imposição do estresse. Em arroz, apesar dos efeitos da toxidez por Fe nos parâmetros fotossintéticos e bioquímicos terem sido parcialmente demonstrados (Pereira et al, 2013; Müller et al, 2015), os mecanismos pelos quais o excesso de Fe afeta os parâmetros fotossintéticos, incluindo  $g_m$ , são ainda largamente desconhecidos.

Com uma abundância relativa de 27,70% na litosfera e 0,03% na biosfera, o silício (Si) é considerado o segundo elemento mais abundante da crosta terrestre (Exley, 1998). Apesar de estar presente nos tecidos vegetais de todas as plantas, o seu conteúdo varia com a espécie, com valores entre 0,1 a 10% da biomassa seca (Ma e Takahashi, 2002). O arroz é um exemplo típico de espécie acumuladora de Si, correspondendo até 10% da biomassa seca. Essa maior quantidade de Si encontrada em arroz, quando comparada com outras gramíneas, ocorre devido à presença de transportadores específicos de influxo (Lsi1- Low silicon rice 1) e efluxo (Lsi2 - Low silicon rice 2) de Si, localizados, respectivamente, nas regiões distais e proximais das células de endoderme e exoderme de raízes laterais (Ma et al, 2006; Ma et al, 2007). Os benefícios gerados pela elevada absorção e incorporação do Si em folhas e colmos são evidenciados pela resistência a ataque de patógenos (Rodrigues et al, 2004; Perez et al, 2014), aumentos no rendimento de grãos e eficiência no uso do nitrogênio (Detmann et al, 2012; Lavinsky et al, 2013). Além disso, diversos trabalhos ainda relatam os efeitos atenuadores do Si em resposta a diferentes fatores de estresse abióticos, tais como: salinidade (Abbas et al, 2015), seca (Zhu e Gong, 2014) e metais (Chika e Huerta, 2008; Sanglard et al, 2014; Song et al, 2014). Apesar desses efeitos positivos, em termos fisiológicos e de produtividade, ainda não há consenso de como o Si atuaria no metabolismo vegetal frente aos diferentes fatores de estresses que promovem respostas tão diversificadas nas plantas, tornando a atuação desse elemento na nutrição de plantas um assunto cientificamente intrigante.

Considerando os impactos negativos de metais tóxicos (e.g., Cd, Zn, Al, Fe, As) no metabolismo vegetal, o uso de medidas paliativas, tal como a fertilização com Si, vem produzindo resultados satisfatórios. Recentemente, Vaculík et al (2015) demonstraram que o Si atenua a toxidez por cádmio (Cd), em *Zea mays*, via manutenção da integridade estrutural dos cloroplastos de células da bainha, que contribuiu para aumento da fotossíntese. Em arroz, sob excesso de Zn, os impactos mitigatórios do Si foram relacionados à expressão de genes que codificam algumas das proteínas da cadeia transportadora de elétrons (CTE), da fotossíntese, sendo o aumento na expressão dos genes *PsbY* (complexo de evolução do oxigênio), *PsaH* (PSI), *PetC* (citocromo  $b_6f$ ) e *PetH* (ferredoxina) responsáveis por aumentos significativos nos parâmetros fotossintéticos (Song et al, 2014). Por outro lado, Sanglard et al (2014) demonstraram que o Si atua potencializando as taxas de fotossíntese, em arroz, via aumento de  $g_m$ . Portanto, parece haver uma vasta gama de efeitos do Si sobre a maquinaria fotossintética, desde a CTE até aumento da concentração de  $CO_2$  no estroma cloroplastídico, o que culminaria com a maximização das taxas fotossintéticas. Para a interação Si/Fe, em arroz, estudos demonstraram que o Si potencializa o metabolismo antioxidante e atenuaria os sintomas da toxidez por Fe por reduzir a formação da placa de Fe no sistema radicular e a concentração desse metal em folhas de arroz (Chalmardi et al, 2014; Dufey et al, 2014). Entretanto, existem muitas lacunas e os impactos dessas respostas nos aspectos fotossintéticos, moleculares e anatômicos, seja nas folhas ou raízes, não foram descritos.

O Fe impacta negativamente a arquitetura radicular por reduzir o crescimento, sendo esta redução evidenciada, principalmente, na iniciação e desenvolvimento de raízes laterais, e tais alterações são reguladas pelos hormônios etileno e auxina (Li et al, 2015). Com efeito, o etileno atua na formação de raízes laterais por induzir a expressão de transportadores de auxina (e.g., *AUX1*) e, sob condições de excesso de Fe, o aumento na produção de etileno em raízes foi considerado um mecanismo de tolerância, pois preveniria o declínio excessivo da emissão de raízes laterais, reduziria o acúmulo de  $Fe^{2+}$  nos tecidos celulares e aumentaria a expressão de ferritinas (*FER1* e *FER2*) (Li et al, 2009; Li et al, 2015). O Si, por sua vez, em condições não-estressantes, atuaria no sistema radicular promovendo a formação de raízes laterais (Ma et al, 2001), além de promover aumento no diâmetro da raiz, suberização da endoderme e lignificação da exoderme (Lavinsky, 2013; Lavinsky et al, 2015). Para a relação Fe/Si, inicialmente foi proposto por Okuda e Takahashi (1961) que a adição

de Si aumentaria o poder de oxidação do  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Mn}^{2+}$ , com consequente precipitação desses elementos na superfície radicular, favorecendo o aumento da placa de ferro, que atuaria como uma barreira física à absorção de Fe. Resultados semelhantes foram obtidos por Lavinsky (2013), que demonstrou que o Si, em condições não-estressantes, favoreceu a formação da placa de Fe via deposição de um precipitado contendo Si-O-Fe nas proximidades da coifa. Entretanto, Dufey et al (2014) e Chalmardi et al (2014) verificaram que o fornecimento de Si reduziu a precipitação de  $\text{Fe}^{2+}$  na superfície de raízes de arroz sob excesso de Fe. Apesar das diferentes respostas do Si frente à condição de cultivo, não se tem uma ideia clara da interação Fe/Si sobre a formação da placa de Fe, pois Dufey et al (2014) e Chalmardi et al (2014) quantificaram, por análise nutricional, o conteúdo total de Fe no órgão, ou seja, o Fe absorvido e adsorvido, sem qualquer distinção para afirmar os efeitos do Si nessa placa. Tal fato leva ao questionamento de qual seria a real interação do Si/Fe na formação da placa de Fe em condição de toxidez de Fe, e tampouco se sabe se o sinergismo entre mudanças morfológicas e anatômicas no sistema radicular promovidas pelo Si poderia conferir tolerância ao excesso de Fe.

De maneira geral, a suplementação com Si apresenta-se como uma alternativa promissora na atenuação de fatores de estresses bióticos e abióticos. Porém, há ainda muitas lacunas abertas a respeito da interação Si/Fe. Diante do exposto, este estudo teve por objetivos buscar responder aos seguintes questionamentos: i) A fertilização com Si pode mitigar os efeitos da toxidez por ferro, no desempenho fotossintético? ii) O Si, por promover alterações anatômicas e moleculares nas raízes e favorecer a formação da placa de Fe no sistema radicular, reduziria a absorção de  $\text{Fe}^{2+}$ ? iii) O Si, por amenizar os efeitos da toxidez por Fe, via redução na absorção desse metal, favoreceria a manutenção da homeostase nutricional? iv) Quais os impactos que a fertilização com Si promoveria em termos de produtividade em arroz cultivado sob excesso de Fe?

## REFERÊNCIAS

- Adamski, J. M.; Danielosk, R.; Deuner, S.; Braga, E.J.B.; Castro, L.A.S.; Peters, J. A.** Responses to excess iron in sweet potato: impacts on growth, enzyme activities, mineral concentrations and anatomy. *Acta Physiologiae Plantarum*, 34: 1-12, 2012.
- Audebert, A.; Fofana, M.** Rice Yield Gap due to Iron Toxicity in West Africa. *Journal Agronomy & Crop Science*, 195: 66–76, 2009.
- Abbas, T.; Balal, R.M.; Shahid, M.A.; Pervez, M.A.; Ayyub, C.M.; Aqueel, M.A.; Javaid, M.M.** Silicon-induced alleviation of NaCl toxicity in okra (*Abelmoschus esculentus*) is associated with enhanced photosynthesis, osmoprotectants and antioxidant metabolism. *Acta Physiologiae Plantarum*. 37: 2-15, 2015.
- Bashir, K.; Ishimaru, Y.; Shimo, H.; Kakei, Y.; Senoura, T.; Takahashi, R.** Rice phenolics efflux transporter 2 (PEZ2) plays an important role insolubilizing apoplasmic iron. *Soil Science and Plant Nutrition*, 57: 803-812, 2011.
- Briat, I. F.; Curie, C.; Gaymard, F.** Iron utilization and metabolism in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 10: 276-282, 2007.
- Chalmardi, Z.C.; Abdolzadeh, A.; Sadeghipour, H.K.** Silicon nutrition potentiates the antioxidant metabolism of rice plants under iron toxicity. *Acta Physiologiae Plantarum*, 36: 493-502, 2014.
- Chika, C. N.; Huerta, A. J.** Effects of silicon nutrition on cadmium uptake, growth and photosynthesis of rice plants exposed to low-level cadmium. *Plant and Soil*, 311: 73-86, 2008.
- Detmann, K. C.; Araújo, W. L.; Martins, S. C. V.; Sanglard, L. M.V.P.; Reis, J. V.; Detmann, E.; Rodrigues, F. A.; Nunes-Nesi, A.; Fernie, A. R.; DaMatta, F. M.** Silicon nutrition increases grain yield, which, in turn, exerts a feed-forward stimulation of photosynthetic rates via enhanced mesophyll conductance and alters primary metabolism in rice. *New Phytologist* 196: 752-762, 2012.
- Dufey, S. G.; Ingabire, A.; Lutts, S.; Bertin, P.** Silicon application in cultivated rices (*Oryza sativa* L and *Oryza glaberrima* Steud) alleviates iron toxicity symptoms through the reduction in iron concentration in the leaf tissue. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 200: 132–142, 2014.
- Exley, C.** Silicon in life: A bioinorganic solution to bioinorganic essentiality. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 69: 139-144, 1998.
- Flexas, J.; Barbour, M. M.; Brendel, O.; Cabrera, H.M.; Carriqui, M., Díaz-Espejo, A.; Douthe, C.; Dreyer, E.; Ferrio, J.P.; Gago, J.; Galléa, A.; Galmés, J., Kodama, N.; Medrano, H.; Niinemets, U.; Peguero-Pina, J.J.; Pou, A.; Ribas-**

**Carbó, M.; Tomás, M.; Tosens, T.; Warren, C.R.** Mesophyll diffusion conductance to CO<sub>2</sub>: Anunappreciated central player in photosynthesis. *Plant Science* 193: 70-84, 2012.

**Jain, A.; Connolly, E.L.** Mitochondrial iron transport and homeostasis in plants. *Frontiers in Plant Science*, 348: 1-6, 2013.

**Lavinsky, A. O.** Efeito do silício na anatomia radicular e na produção de grãos de arroz. (Tese Doutorado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 93f, 2013.

**Lavinsky, A.O.; Detmann, K.C.; Sanglard, L.M.V.P.; Rodrigues, F.A.; Araújo, L.; Ribeiro, D.; Araújo, W.A.; DaMatta, F.M.** Silicon enhances root diameter and aerenchyma formation and induces changes in metabolism and fermentative pathway in waterlogged rice plants via ethylene-signaling pathways. In: *Anais do XV Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal, Foz do Iguaçu, 2015 (em CD ROM)*.

**Li, Y.; Gao, Y.; Xu, X.; Shen, Q.; Guo, S.** Light-saturated photosynthetic rate in hinhg-nitrogen rice (*Oryza sativa* L.) leaves is related to choroplastic CO<sub>2</sub> concentration. *Journal of Experimental Botany*, 60: 2351-2360, 2009.

**Li, G.; Song, H.; Li, B.; Kronzucker, H.J.; Shi, W.** Auxin Resistant1 and PIN-FORMED2 Protect Lateral Root Formation in Arabidopsis under Iron Stress. *Plant Physiology*, 169: 2608-2623, 2015.

**Ma, J.F.; Goto, S.; Tamai, K.; Ichii, M.** Role of root hairs and lateral roots in silicon uptake by rice. *Plant Physiology*, 127: 1773-1780, 2001.

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

**Ma, J.F.; Yamaji, N.; Mitani, N.; Tamai, K., Tamai, K.; Katsuhara, M.; Yano, M.** An efflux transporter of silicon in rice. *Nature*, 448: 209-213, 2007.

**Ma, J.F.; Takahashi, E.** Soil, fertilizer, and plant silicon research in Japan, Amsterdam, the Netherlands: Elsevier Science, 2002.

**Marafon, A. C.; Endres, L.** Silicon: fertilization and nutrition in higher plants. *Revista Ciências Agrárias*, 56: 380-388, 2013.

**Müller, C.; Kuki, K, N.; Pinheiro, D.T.; Souza, L.R.S.; Silva, A.I.S.; Loureiro, M.E.; Oliva, M.A.; Almeida, A.M.** Differential physiological responses in rice upon exposure to excess distinct iron forms. *Plant and Soil*, 391:123-138,2015.

**Okuda, A.; Takahashi, E.** Studies on the physiological role of silicon in cropplant. In: effect of various amount of silicon supply on the growth of rice plantand its

nutrients uptake. *Japanese Journal of Soil Science and Plant Nutrition*. 32: 533-537, 1961.

**Platt-Aloia, K.A.; Thomson, W.W.; Terry, N.** Changes in Plastid ultrastructure during iron nutrition-mediated chloroplast development. *Protoplasma*, 114: 85-92, 1983.

**Pereira, E.G.; Oliva, M. A.; Rosado-Souza, L.; Mendes, G. C.; Colares, D, S.; Stopato, C. H.; Almeida, A. M.** Iron excess affects rice photosynthesis through stomatal and non-stomatal limitations. *Plant Science*, 202: 81-89, 2013.

**Perez, C. E. A.; Rodrigues, F. Á.; Moreira, W. R.; DaMatta, F. M.** Leaf Gas Exchange and chlorophyll a Fluorescence in Wheat Plants Supplied with Silicon and Infected with *Pyricularia oryzae*. *Phytopathology*, 104:143-149, 2014.

**Ricachenevsky, F.K.; Sperotto, R.A.; Menguer, P.K.; Sperb, E.R.; Lopes, K.L.; Fett, J.P.;** Zinc-induced facilitator-like family in plants: lineage-specific expansion in monocotyledons and conserved genomic and expression features among rice (*Oryza sativa*) paralogs. *BMC Plant Biology*, 11: 20-29, 2011.

**Ricachenevsky, F. K.; Sperotto, R. A.** There and back again, or always there? The evolution of rice combined strategy for Fe uptake. *Frontiers in Plant Science*, 5:189, 2014.

**Rodrigues, F.Á.; McNally, D.J.; Datnoff, L.E.; Jones, J.B., Labbé, C.; Benhamou, N.; Menzies, J.; Bélanger, R. R.** Silicon Enhances the Accumulation of Diterpenoid Phytoalexins in Rice: A Potential Mechanism for Blast Resistance. *Biochemistry and Cell Biology*, 94: 177-183, 2004.

**Santana, B.V.N.; Araújo, T.O.; Andrade, G.C.; Freitas-Silva, L.F.; Kuki, K.N.; Pereira, E.G.; Azevedo, A.A.; Silva, L.C.** Leaf morphoanatomy of species tolerant to excess iron and evaluation of their phytoextraction potential. *Environmental Science and Pollution Research*. 21:2550–2562, 2014.

**Sanglard, L. M.V.P.; Martins, S. C. V.; Detmann, K. C.; Silva, P.E.M.; Lavinsky, A.O.; Silva, M.M.; Detmann, E., Araújo, W. L.; DaMatta, F. M.** Silicon nutrition alleviates the negative impacts of arsenic on the photosynthetic apparatus of rice leaves: an analysis of the key limitations of photosynthesis. *Physiologia Plantarum*, 152: 355-366, 2014.

**Sanglard, L. M.V.P.; Detmann, K. C.; Martins, S. C. V.; Teixeira, R. A.; Pereira, L. F.; Sanglard, M.L.; Fernie, A. R.; Araújo, W. L.; DaMatta, F. M.** The role of silicone in metabolic acclimation of rice plants challenged with arsenic. *Environmental and Experimental Botany*. 123: 22-36, 2016.

**Sagardoy, R. Vázquez, S.; Florez-Sarasa, I.D.; Albacete, A.; Ribas-Carbó, M.; Flexas, J. Abadía, J.; Molares, F.** Stomatal and mesophyll conductances to CO<sub>2</sub> are the main limitations to photosynthesis in sugar beet (*Beta vulgaris*) plants grown with excess zinc. *New phytologist* 187:145-158,2010.

**Silveira, V.C.; Fadanelli, C.; Sperotto, R. A.; Stein, R.J.; Basso, L.A.; Santos, D.S.S.; Junior, I. S.V.; Dias, J.F.; Fett, J.P.** Role of ferritin in the rice tolerance to iron overload. *Scientia Agricola* 66: 549-555, 2009.

**Stein, R.J.; Duarte, G.L.; Spohr, M.G.; Lopes, S.I.G.; Fett, J.P.** Distinct physiological responses of two rice cultivars subjected to iron toxicity under field conditions. *Annals of Applied Biology*, 154: 269-277, 2009.

**Stein, R.J.; Lopes, S.I.G.; Fett, J.P.** Iron toxicity in field-cultivated rice: contrasting tolerance mechanisms in distinct cultivars. *Theoretical and Experimental Plant Physiology*.26:135-146 2014.

**Sperotto, R.A.; Ricachenevsky, F.L.; Stein, R.J.S.; Waldow, V.A.; Fett, J. P.** Iron stress in plants: Dealing with deprivation and overload. *Plant Stress* 4:57-69, 2010.

**Sperotto, R. A.; Vasconcelos, M. W.; Grusak, M.A.; Fett, J.P.** Effects of diferent Fe supplies on mineral partitioning and remobilization during the reproductive development of rice (*Oryza sativa* L.). *Rice Spring Open Journal*, 5: 1-11, 2012.

**Song, A.; Li, P.; Fan, F.; Li, Z.; Liang, Y.** The Effect of Silicon on Photosynthesis and Expression of Its Relevant Genes in Rice (*Oryza sativa* L.) under High-Zinc Stress. *Plos One*, 26: 1-21, 2014.

**Thomine, S.; Vert, G.** Iron transport in plants: better be safe than sorry. *Current Opinion in Plant Biology*, 16: 322-327, 2013.

**Vaculík, M., Pavlovic, A., Lux, A.** Silicon alleviates cadmium toxicity by enhanced photosynthetic rate and modified bundle sheath's cell chloroplasts ultrastructure in maize. *Ecotoxicology Environment Safety* 120: 66-73, 2015.

**Velikova, V.; Tsonev, T.; Loreto, F.; Centritto, M.** Changes in photosynthesis, mesophyll conductance to CO<sub>2</sub>, and isoprenoid emissions in *Populus nigra* plants exposed to excess nickel. *Environmental Pollution* 159: 1058-1066, 2011.

**Vigani, G., Zocchi, G., Bashir, K., Philippar, K., Briat, J.F.** Signals from chloroplasts and mitochondria for iron homeostasis regulation. *Trends in Plant Science*, 18: 305-311, 2013.

**You-Qiang, F, Hong, SHEN 1.; Dao-Ming, W, Kun-Zhen, C.** Silicon-Mediated Amelioration of Fe<sup>2+</sup> Toxicity in Rice (*Oryza sativa* L.) Roots. *Pedosphere* 22: 795-802, 2012.

**Zhang, Y.; Zheng, G.H.; Liu, P., Song, J.M., Xu, G, D.; Cai, M.Z.** Morphological and physiological responses of root tip cells to Fe<sup>2+</sup> toxicity in rice. *Acta Physiologiae Plantarum*, 33: 683-689, 2011.

**Zhu, Y.; Gong, H.** Beneficial effects of silicon on salt and drought tolerance in plants. *Agronomy for Sustainable Development*, 34: 455-472,2014.

## CAPÍTULO I

SANTOS, Martielly Santana, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2017. **O silício atenua a toxidez de ferro em arroz preservando a capacidade fotossintética via ajustes na condutância foliar, com impactos mínimos no metabolismo do carbono.** Orientador: Fábio Murilo da Matta.

### RESUMO

A toxicidade de ferro (Fe) é reconhecida como o distúrbio nutricional de maior destaque em arroz alagado, afetando processos vitais como a respiração e a fotossíntese. Por outro lado, a fertilização com silício (Si) pode atenuar os impactos negativos promovidos por metais tóxicos e, apesar de algumas poucas informações sugerirem que o Si pode mitigar a toxidez por Fe, os mecanismos são desconhecidos. Diante disso, o presente trabalho objetivou avaliar o potencial mitigatório do Si sobre a toxidez por Fe, avaliando-se a fotossíntese e o metabolismo do carbono. Para isso, duas cultivares com tolerâncias diferenciais ao excesso de Fe (EPAGRI-109 e BR-IRGA-409, tolerante e sensível a toxidez de Fe, respectivamente). As plantas foram cultivadas em solução nutritiva não-aerada e suplementadas com Si (0 e 2 mmol L<sup>-1</sup>) e Fe (25 µmol L<sup>-1</sup> e 5 mmol L<sup>-1</sup>). A toxidez por Fe impactou negativamente a taxa fotossintética líquida (A) ao reduzir as condutâncias estomática (g<sub>s</sub>) e mesofílica (g<sub>m</sub>) e aumentar a fotorrespiração em ambas as cultivares. Por outro lado, a fertilização com Si atenuou tais efeitos via redução do teor de Fe em folhas e raízes, o que, indiretamente, parece ter favorecido um aumento em A por atenuar a queda da condutância foliar ao CO<sub>2</sub> nas plantas sob excesso de Fe. Com efeito, os tratamentos com Fe e/ou o Si afetaram minimamente os parâmetros fotoquímicos e bioquímicos da fotossíntese, bem como a atividade das enzimas do metabolismo do carbono. Como um todo, estes resultados sugerem notável homeostase metabólica e reforçam a importância de aspectos difusionais em relação aos bioquímicos no controle de A em condições de toxidez por Fe. Assim, a fertilização com Si revela-se uma alternativa promissora na mitigação da toxidez Fe ao reduzir o teor Fe na planta e promover melhor desempenho fotossintético em cultivares de arroz.

## 1. INTRODUÇÃO

O ferro (Fe) é um micronutriente que desempenha papel crucial no metabolismo vegetal, uma vez que participa de reações redox da fotossíntese, respiração e assimilação de nitrogênio (Ricachenevsky et al, 2010; Vigani et al, 2013). Contudo, quando em excesso, o Fe está associado ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), via reação de Fenton e Haber-Weiss (Onaga et al, 2016), promovendo distúrbios morfofisiológicos, que vão desde danos celulares à redução da taxa fotossintética, acompanhada de fotoinibição (Pereira et al, 2013), desordem nutricional (Müller et al, 2015), bronzeamento das folhas, formação da placa de ferro na raiz (Pereira et al, 2014; Pinto et al, 2016) e redução na biomassa (Audebert e Fofana, 2009; Stein et al, 2009). Esses sintomas são especialmente evidentes em arroz de cultivo de alagado, devido à quantidade excessiva de íons ferrosos ( $\text{Fe}^{2+}$ ) gerados pela redução de óxidos de Fe em condições de solos ácidos e anóxicos.

Em arroz, a toxidez por Fe pode ser direta, causada pelo acúmulo excessivo do metal, ou indireta, quando há desordens nutricionais promovidas pela redução na absorção de P, K, Ca e Mg (Silveira et al, 2007; Stein et al, 2009; Müller et al, 2015). Em ambos os casos, a toxicidade por Fe promove alterações fisiológicas, cuja magnitude depende da tolerância da cultivar, da severidade e do tempo de imposição do estresse (Stein et al, 2009; Stein et al, 2014). Na folha, o Fe pode potencializar o estresse oxidativo e impactar a fotossíntese via alterações na fase fotoquímica, bem como por limitações estomáticas e não-estomáticas ao processo fotossintético (Pereira et al, 2013; Müller et al, 2015; Pinto et al, 2016). Em todo caso, considerando-se que o Fe, complexado com ácidos orgânicos, é translocado para a parte aérea via fluxo transpiracional, a redução na condutância estomática ( $g_s$ ), apesar de acarretar decréscimos na taxa fotossintética, poderia ser vista como um mecanismo de tolerância ao estresse, na medida em que poderia acarretar menor acúmulo do metal na planta (Asch et al, 2005; Pinto et al, 2016). Além de  $g_s$ , a capacidade fotossintética é, também, influenciada pela condutância mesofílica ( $g_m$ ), a qual está relacionada à difusão do  $\text{CO}_2$ , dos espaços intercelulares até os sítios de carboxilação no estroma dos cloroplastos (Flexas et al, 2012). Não há informações sobre os efeitos da toxidez por Fe em  $g_m$ , embora os efeitos de outros metais tóxicos sobre  $g_m$  vêm sendo relatados (Sagardoy et al, 2010; Velikova et al, 2011).

O Si é o segundo elemento mais abundante da crosta terrestre (Exley, 1998) e, no solo, está na forma de silicatos (alumínio, cálcio, ferro, etc), com concentrações que variam entre 1 a 45%, dependendo das características físico-químicas do solo (Sommer et al, 2006). Em ambientes alagados, a condição de anaerobiose e baixo pH favorece a formação do ácido monossilícico ( $H_4SiO_4$ ), que é a forma normalmente absorvida pelas plantas. Para arroz alagado, o Si é absorvido por meio de transportadores específicos de influxo (Lsi1- Low silicon rice 1) e efluxo (Lsi2 - Low silicon rice 2), respectivamente presentes nas regiões distais e proximais das células de endoderme e exoderme de raízes laterais (Ma et al, 2006; Ma et al, 2007). A exportação do Si, da raiz para a parte aérea, é, por seu turno, mediada pelo transportador de influxo (Lsi 6- Low silicon rice 6), responsável pelo redirecionamento do Si nas folhas, bainhas e colmos (Yamaji et al, 2008; Yamaji e Ma, 2009). Em condições não-estressantes, estudos vêm demonstrando que, em arroz, o Si impacta a fotossíntese via aumentos em  $g_s$  (Lavinsky et al, 2016) e  $g_m$  (Detmann et al, 2012), favorecendo, assim, a difusão de  $CO_2$  até o cloroplasto e, conseqüentemente, um melhor desempenho fotossintético, com reflexos na produtividade (Lavinsky et al, 2016). Além disso, o Si parece estar associado com a modulação do metabolismo dos aminoácidos (Detmann et al, 2013) e com o aumento da eficiência no uso do nitrogênio (Detmann et al, 2012). Efeitos positivos da fertilização com Si sobre o metabolismo e desempenho fotossintético têm sido verificados, também, em condição ambiental adversa, como sob toxidez por zinco (Song et al, 2014), cádmio (Chika e Huerta, 2008), alumínio (Liang et al, 2001) e arsênio (Sanglard et al, 2014). No caso do arsênio (As), os efeitos atenuadores do Si, além de estarem relacionados com a melhora na performance fotossintética (Sanglard et al, 2014), foram também associados à redução dos teores do metalóide nos tecidos foliares, promovida pela modulação na expressão de genes relacionados à absorção e translocação de Si/As, sem, contudo, haver alterações drásticas na atividade das enzimas do metabolismo do carbono (Sanglard et al, 2016).

A compreensão das respostas fisiológicas para interação Fe/Si ainda é incipiente e, apesar de alguns estudos demonstrarem que o Si potencializa o metabolismo antioxidante e atenua os sintomas da toxidez por ferro, via redução de sua concentração nas folhas (Chalmardi et al, 2014; Dufey et al, 2014), não há informações sobre os mecanismos pelos quais o Si poderia atenuar a toxidez de Fe, em arroz, no que se refere aos aspectos fotossintético, bioquímico e nutricional. Neste

estudo, hipotetiza-se que o Si possa mitigar os efeitos da toxidez por Fe sobre o desempenho fotossintético, particularmente em cultivares sensíveis à toxidez por Fe. Especificamente, pretendeu-se responder aos seguintes questionamentos: i) A fertilização com silício poderia atenuar a toxidez por Fe sobre a maquinaria fotossintética? ii) O Si seria capaz de favorecer a homeostase metabólica, mesmo sob excesso de Fe? Para responder essas perguntas, duas cultivares de arroz, contrastantes quanto a tolerância ao excesso de Fe, foram cultivadas e os efeitos da suplementação do Si foram avaliados.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Condições de cultivo e imposição dos tratamentos

O experimento foi conduzido em casa de vegetação no Campus da Universidade Federal de Viçosa (649m, 20°45'20''S e 42°52'40''N), MG, Brasil. Foram utilizadas duas cultivares de arroz (*Oryza sativa* L.: BR-IRGA-409, caracterizada como sensível ao estresse por Fe, e EPAGRI-109, como tolerante (Stein et al, 2009; Stein et al, 2014). As sementes foram lavadas em solução de hipoclorito de sódio por 1 min, seguidas de lavagem em água desionizada por 3 min. Foram germinadas em papel-filtro por 4 dias no escuro, sendo posteriormente transferidas para câmara de germinação BOD com luz artificial ( $180 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  fótons) sob um ciclo de 12/12 h diurno/noite, com umidade relativa de 60/75% e temperatura de 30°C, por um período de 11 dias.

As plantas foram cultivadas em hidroponia, sem aeração, em vasos de 5 L, contendo solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950) com modificações, constituída de  $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ ;  $\text{KNO}_3$ ;  $0,25 \text{ mmol L}^{-1}$   $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ ;  $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$   $\text{NH}_4\text{Cl}$ ;  $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$   $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ;  $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ ;  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ;  $0,30 \mu\text{mol L}^{-1}$   $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ;  $0,33 \mu\text{mol L}^{-1}$ ;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ;  $11,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ ;  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ;  $3,5 \mu\text{mol L}^{-1}$   $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ;  $0,1 \mu\text{mol L}^{-1}$   $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ;  $25 \mu\text{mol L}^{-1}$   $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  e  $25 \mu\text{mol L}^{-1}$  EDTA disódico. As plantas foram fertilizadas com Si (ao longo de todo o experimento), nas concentrações de 0 (-Si) ou  $2 \text{ mmol L}^{-1}$  (+Si), fornecido na forma de ácido monossilícico ( $\text{H}_4\text{SiO}_4$ ), obtido pela passagem do silicato de potássio através de uma coluna trocadora de cátions (AMBERLITE IR-120B;  $\text{H}^+$  form; Sigma- Aldrich, São Paulo, Brasil). O pH da solução de cultivo foi ajustado diariamente para 5,0, utilizando-se NaOH ( $1 \text{ mol L}^{-1}$ ) ou HCl ( $1 \text{ mol L}^{-1}$ ). O experimento foi conduzido em casa de vegetação climatizada, como temperatura ajustada para  $30 (\pm 2) ^\circ\text{C}$ , sob iluminação natural ( $\sim 1500 \mu\text{mol fótons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ).

Plantas com 45 dias (estádio vegetativo) foram submetidas ao estresse por excesso de Fe, aplicado na forma de Fe-EDTA ( $\text{FeSO}_4$ ), na concentração de  $25 \mu\text{mol L}^{-1}$  (plantas-controle) ou  $5 \text{ mmol L}^{-1}$ , correspondente à condição ambiental de excesso de Fe, típica da região Sul do Brasil, a segunda maior produtora de arroz do país (Stein et al, 2014). Todas as avaliações e amostragens foram realizadas aos 8 e 15 dias após aplicação do tratamento (DAAT) de Fe.

## 2.2 Quantificação do Si e Fe em folhas e raízes

Folhas e raízes foram coletadas e secas em estufa com circulação forçada de ar a 60 °C, até massa constante. Em seguida, o material vegetal foi triturado e a concentração de Si nesses órgãos foi determinada colorimetricamente (Dallagnol et al, 2011). O Fe foi extraído por digestão nitroperclórica e sua concentração determinada por espectrometria de absorção atômica (Malavolta et al, 1989).

## 2.3 Medições de trocas gasosas foliares e a análise das limitações à fotossíntese

A taxa fotossintética líquida (A) e a taxa de transpiração foliar (E) foram medidas simultaneamente aos parâmetros de fluorescência da clorofila a, utilizando-se de um analisador de gases a infravermelho (modelo LI 6400XT LI-COR, Lincoln, NE, EUA), equipado com um fluorômetro, (LI-6400-40, LICOR Inc.). As mensurações foram feitas na folha principal e completamente expandida do perfilho, das 10:00 às 14:00 h, sob radiação fotossinteticamente ativa (RFA) artificial de 1000  $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  em nível de folha, e 400  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ ar}$ . A concentração intercelular de  $\text{CO}_2$  ( $C_i$ ) e a condutância estomática ao vapor de água ( $g_s$ ) foram calculadas pelo referido equipamento a partir dos valores de A e E (von Caemmerer e Farquhar, 1981). Todas as medições foram realizadas fixando-se a temperatura do bloco em 25°C, e o déficit de pressão de vapor mantido em cerca de 1,0 kPa, enquanto a quantidade de luz azul foi de 10% de RFA para otimizar a abertura estomática.

A eficiência fotoquímica do fotossistema II ( $\phi_{\text{FSII}}$ ) foi determinada pela medição do estado estável da fluorescência ( $F_s$ ) e da fluorescência máxima ( $F_m'$ ), utilizando-se de um pulso de luz saturante de aproximadamente 8000  $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , seguindo procedimentos descritos por Genty et al (1989). A taxa de transporte de elétrons (J) foi calculada como  $J = \phi_{\text{FSII}} \times \beta \times \alpha \times \text{RFA}$ , em que  $\alpha$  é a absorvância da folha e  $\beta$  reflete o particionamento dos pacotes de energia entre os fotossistemas I e II, determinado conforme Valentini et al (1995), a partir da relação entre A e  $\text{RFA} \times \phi_{\text{FSII}}/4$  obtidos pela variação da intensidade de luz sob condições não fotorrespiratórias. Estimativas da condutância do mesofílica ( $g_m$ ) foram realizadas usando o método de Harley et al (1992), em que:

$$g_m = A / (C_i - (I^* (J + 8 (A + R_i)) / (J - 4 (A + R_i))))$$

Para transformar as curvas  $A/C_i$  em curvas  $A/C_c$  ( $C_c$  = concentração de  $\text{CO}_2$  nos sítios de carboxilação),  $C_c$  foi calculada de acordo com Harley (1992), em que  $C_c = C_i$

- ( $A/g_m$ ). A taxa máxima de carboxilação limitada pela Ribulose-1,5-bisfosfato ( $V_{cmax}$ ) e a taxa máxima de carboxilação limitada pela taxa de transporte de elétrons ( $J_{max}$ ), obtidas para cada curva  $A/C_c$ , foram estimadas por meio de técnicas de regressão não linear, baseadas nas equações de Farquhar et al (1980). A taxa de fotorrespiração foi estimada pela fórmula  $FR = 1/12 (J - (4(A + R_d)))$ . As correções dos vazamentos de  $CO_2$  e vapor de água dentro e fora da câmara do LI-6400 foram aplicadas para todos os dados de trocas gasosas, conforme descrito por Rodeghiero et al (2007).

As limitações fotossintéticas foram particionadas em limitações estomáticas (LE), mesofílicas (LM), e bioquímicas (LB) sendo calculadas a partir dos valores obtidos de  $A$ ,  $g_s$ ,  $g_m$ ,  $V_{cmax}$ ,  $I^*$ ,  $C_c$  a  $K_m = K_c (1 + O/K_o)$ , de acordo com Grassi e Magnani (2005):

$$LE = \frac{g_{tot} \times k}{g_{sCO_2} (g_{tot} + k)}, \quad LM = \frac{g_{tot} \times k}{g_m (g_{tot} + k)}, \quad LB = \frac{g_{tot}}{g_{tot} + k}$$

em que  $g_s$   $CO_2$  é a condutância estomática ao  $CO_2$ ,  $g_m$  a condutância mesofílica e  $g_{tot}$  a condutância total, determinado como:  $g_{tot} = 1 / [(1/g_s) + (1/g_m)]$ , e  $k$  a primeira derivativa de  $A$  em relação a  $C_c$ :  $k = V_{cmax} \times (I^* + K_m) \times (C_c + K_m)$ , sendo  $K_m$  a constante de Michaelis-Menten para o  $CO_2$ , que considera a inibição competitiva em relação ao  $O_2$ .

## 2.4 Metabólitos

Amostras de folhas, do perfilho principal, foram coletadas ao meio-dia, imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e então armazenadas a  $-80^\circ C$ , sendo posteriormente liofilizadas a  $-48^\circ C$  e maceradas. Uma amostra de 10 mg de tecido moído foi adicionada a metanol puro, e a mistura foi incubada a  $70^\circ C$ , durante 30 min. Após centrifugação ( $13000 \times g$ , 5 min), quantificaram-se as concentrações de glicose, frutose e sacarose no sobrenadante, e a de amido a partir do pellet insolúvel em metanol (Praxedes et al, 2006; Ronchi et al, 2006). As concentrações de malato e fumarato foram determinadas em alíquotas do sobrenadante, de acordo com Nunes-Nesi et al (2007).

As concentrações de NAD(H) e NADP(H) foram determinadas por hidrólise de NAD(P)H em meio ácido, e de  $NAD(P)^+$ , em meio alcalino (Ronchi et al, 2006). Para a determinação de  $NAD(P)^+$ , a amostra vegetal foi misturada com 0,4 mL de  $0,1 \text{ mol L}^{-1} HClO_4$ . A suspensão foi aquecida durante 2 min e por centrifugação (10 min a

10000 x g). Em seguida, neutralizou-se 0,1 mL da fração solúvel por adição de 0,1 mL de 1 mol L<sup>-1</sup> Tris (pH 7,4) e KOH 0,1 mol L<sup>-1</sup>, seguido de incubação em gelo, durante 15 min. Para NAD(P)H, a amostra foi misturada com 0,4 mL de KOH 0,1 mol L<sup>-1</sup>. A suspensão foi tratada como descrito acima, exceto a neutralização, que foi feita pela adição de 0,1 mL de 1 Tris (pH 7,4) e HClO<sub>4</sub> 0,1 mol L<sup>-1</sup>. Finalmente, com os sobrenadante, foram determinados os níveis de NAD(P)<sup>+</sup> ou NAD(P)H por meio de ensaios enzimáticos com base no protocolo descrito em Gibon et al (2004).

## **2.5 Atividades enzimáticas**

Amostras de folhas do perfilho principal foram coletadas ao meio-dia, imediatamente congeladas e maceradas em nitrogênio líquido e então, armazenadas a -80°C. Os extratos enzimáticos foram preparados como descrito por Nunes-Nesi et al (2007). Citrato sintase, piruvato cinase (PK), fosfoglicerato-cinase (PGK) e fosfofructocinase dependente de ATP (ATP-PFK) foram determinadas de acordo com Gibon et al (2004); isocitrato desidrogenase dependente de NADP (NADP-IDH) e malato desidrogenase dependente de NAD (NAD-MDH), de acordo com Jenner et al (2001); aldolase, enolase, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase dependente de NAD (NAD-GAPDH) e triose-fosfato isomerase (TPI), de acordo com Fernie et al (2001); e invertases ácida e alcalina e sacarose sintase (SuSy) foram determinadas de acordo com Praxedes et al (2006). A atividade da RuBisCo foi ensaiada como descrito em Sharkey et al (1991).

## **2.6 Proteínas solúveis e pigmentos**

A concentração de proteína solúvel foi determinada conforme Bradford (1976), utilizando-se BSA como padrão. As clorofilas (a + b) foram extraídas utilizando-se acetona aquosa 80% (v/v) e quantificadas espectrofotometricamente, de acordo com Lichtenthaler (1987).

## **2.7 Análise estatística**

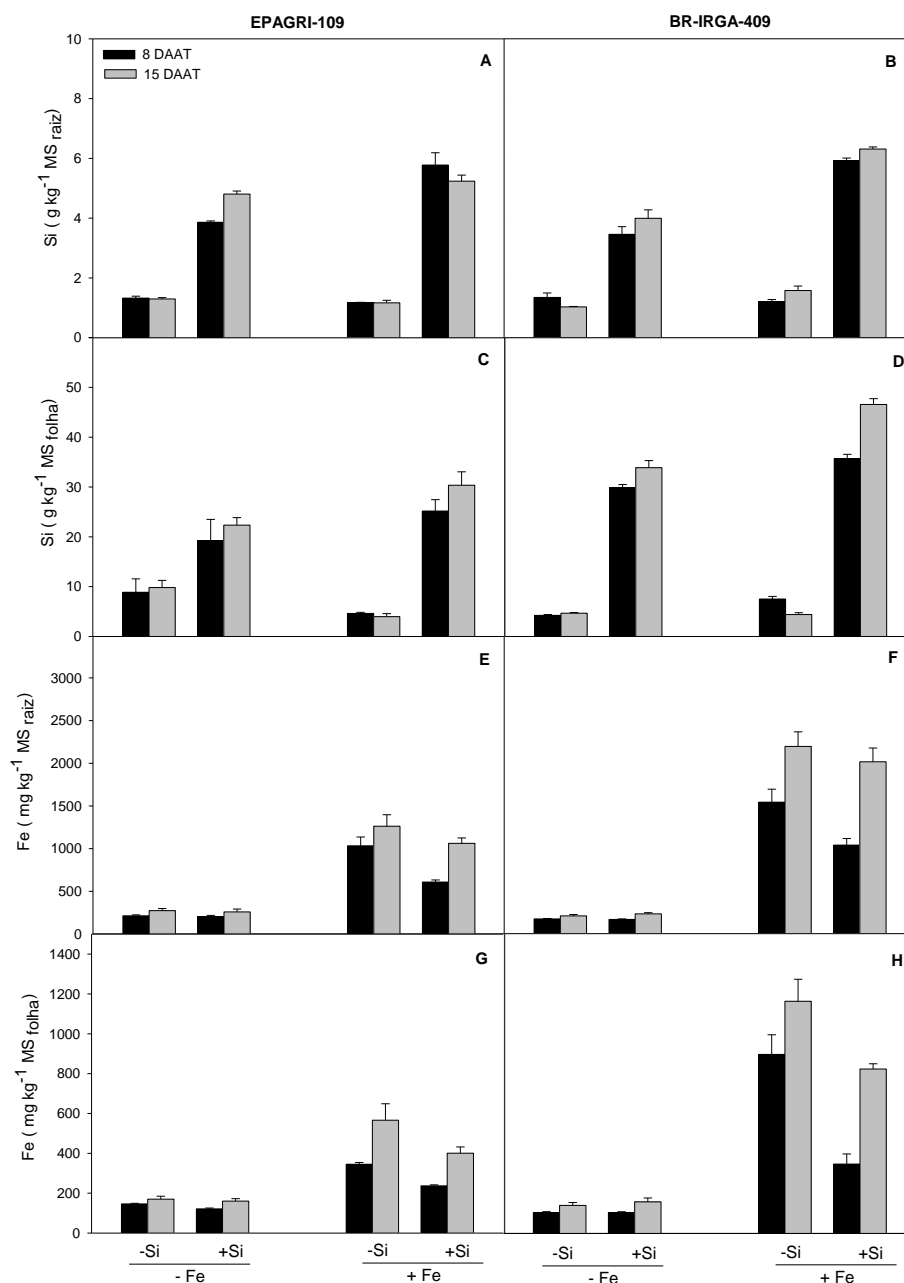
O experimento foi montado em um delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial triplo 2x2x2 (duas cultivares x duas concentrações de Fe x duas concentrações de Si), com seis repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância (three-way ANOVA com todos os fatores avaliados com fatores fixos) usando-se o procedimento MIXED do SAS (versão 9.1) e um  $\alpha = 0.05$ . Quando não

ocorreu interação significativa, o MIXED foi usado para interpretar o efeito de dependência entre os fatores. A análise de regressão foi usada para avaliar a relação entre algumas variáveis.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 O Si reduz a concentração de Fe, especialmente na parte aérea

Os teores de Si nas cultivares BR-IRGA-409 (sensível ao excesso de Fe) e EPAGRI-109 (tolerante ao excesso de Fe) foram maiores quando houve a adição de Si ao meio de cultivo, com maiores concentrações, em média, nas folhas ( $30,5 \text{ g kg}^{-1}$ ) do que nas raízes ( $3,7 \text{ g kg}^{-1}$ ) (Tabela 1 e Fig 1A-D). Independentemente do Si e do tempo de imposição do estresse, a toxidez de Fe acarretou maiores teores de Fe na cultivar sensível nas raízes ( $1700,6 \text{ mg kg}^{-1}$ , em média) que nas folhas ( $806,7 \text{ mg kg}^{-1}$ , em média), quando comparada com a cultivar tolerante, cujos teores médios de Fe (sem suplementação de Si) foram de  $991,5 \text{ mg kg}^{-1}$  nas raízes e  $387,3 \text{ mg kg}^{-1}$  nas folhas (Fig 1). Em todo o caso, os teores de Fe, tanto em folhas como em raízes, foram maiores aos 15 que aos 8 DAAT, em ambas as cultivares. Em contrapartida, nas plantas +Si+Fe o nível de Fe foi significativamente reduzido nas folhas e raízes, independentemente da cultivar e do tempo de imposição do estresse por Fe (Tabela 1 e Fig 1E-H), porém mais marcadamente na cultivar sensível. Registre-se que os efeitos mitigatórios do Si traduziram-se em reduções dos teores de Fe em maior extensão nas folhas que nas raízes.



**Fig 1.** Efeitos do silício, Si (0 ou 2 mmol L<sup>-1</sup>: -Si ou + Si, respectivamente) e do ferro, Fe (25 μmol L<sup>-1</sup> e 5 mmol L<sup>-1</sup>: -Fe e +Fe, respectivamente) na concentração de Si (A-B) e de Fe (E-F) nas raízes, e Si (C-D) e Fe (G-H) nas folhas, em duas cultivares de arroz [EPAGRI-109 e IRGA-409, tolerante e sensível a toxidez de Fe, respectivamente], cultivadas em solução nutritiva. As medições foram realizadas aos 8 ou 15 dias após a adição de Fe (DAA). n = 5 ± SE

### 3.2 O Si reverte parcialmente os efeitos negativos do excesso de Fe sobre as taxas fotossintéticas, fundamentalmente por impactar a condutância difusiva foliar, com alterações mínimas na capacidade fotoquímica e bioquímica

Nas plantas -Si, a toxidez por Fe acarretou reduções na taxa fotossintética líquida (A) e nas condutâncias estomáticas (g<sub>s</sub>) e mesofílicas (g<sub>m</sub>) em ambas cultivares,

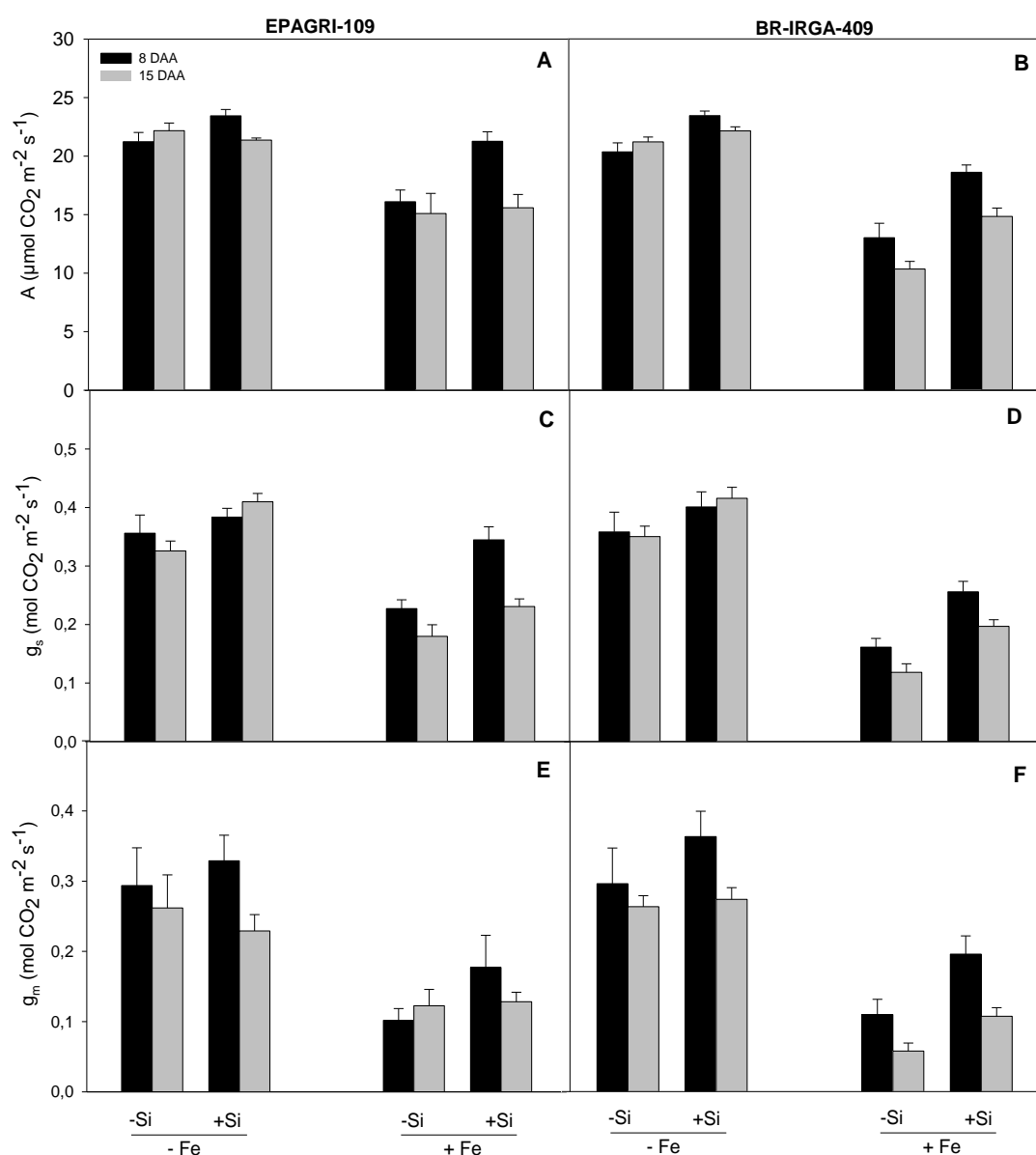
porém com efeito mais pronunciado na cultivar sensível ao Fe. Os efeitos do Si nas plantas -Fe foram não significativos, sugerindo que os efeitos positivos do Si foram manifestados apenas nas plantas +Fe (interação Si x Fe significativa). De fato, tanto A como  $g_s$  e  $g_m$  correlacionaram-se ( $r^2 \geq 0,83$ ) com os teores de Fe nas folhas (Fig. 1 Suplementar). Essas respostas demonstram a característica intrínseca e diferenciada das cultivares quanto à tolerância a toxidez por Fe ao longo do período de 15 dias de imposição do estresse (interação Fe x Ct significativa) (Tabela 1).

**Tabela 1-** Resultado da ANOVA ( ns = não significativo; \*P< 0.05; \*\*P <0.01; \*\*\*P<0.001) para os efeitos do silício (Si), Ferro ( Fe) e cultivar (Ct), e suas interações, para as concentrações de Si e Fe na raízes e folhas; taxa de assimilação de CO<sub>2</sub> (A), condutância estomática ( $g_s$ ), condutância mesofílica ( $g_m$ ); limitações estomáticas (LS), mesofílicas (LM) e bioquímicas (LB); taxa máxima de carboxilação ( $V_{cmáx}$ ); taxa máxima de carboxilação limitada pela taxa de transporte de elétrons ( $J_{máx}$ ); razão da taxa de transporte de elétrons destinados à oxigenação/carboxilação ( $J_o/J_c$ ); rendimento quântico máximo do fotossistema II ( $F_v/F_m$ ); rendimento quântico efetivo do fotossistema II ( $F'_v/F'_m$ ); coeficiente de extinção fotoquímico ( $q_p$ ). Os resultados são apresentados na forma x/y, i.e. após 8 e 15 dias após a adição de Fe. Quando os resultados foram iguais nas duas épocas, usou-se a mesma significância para ambos.

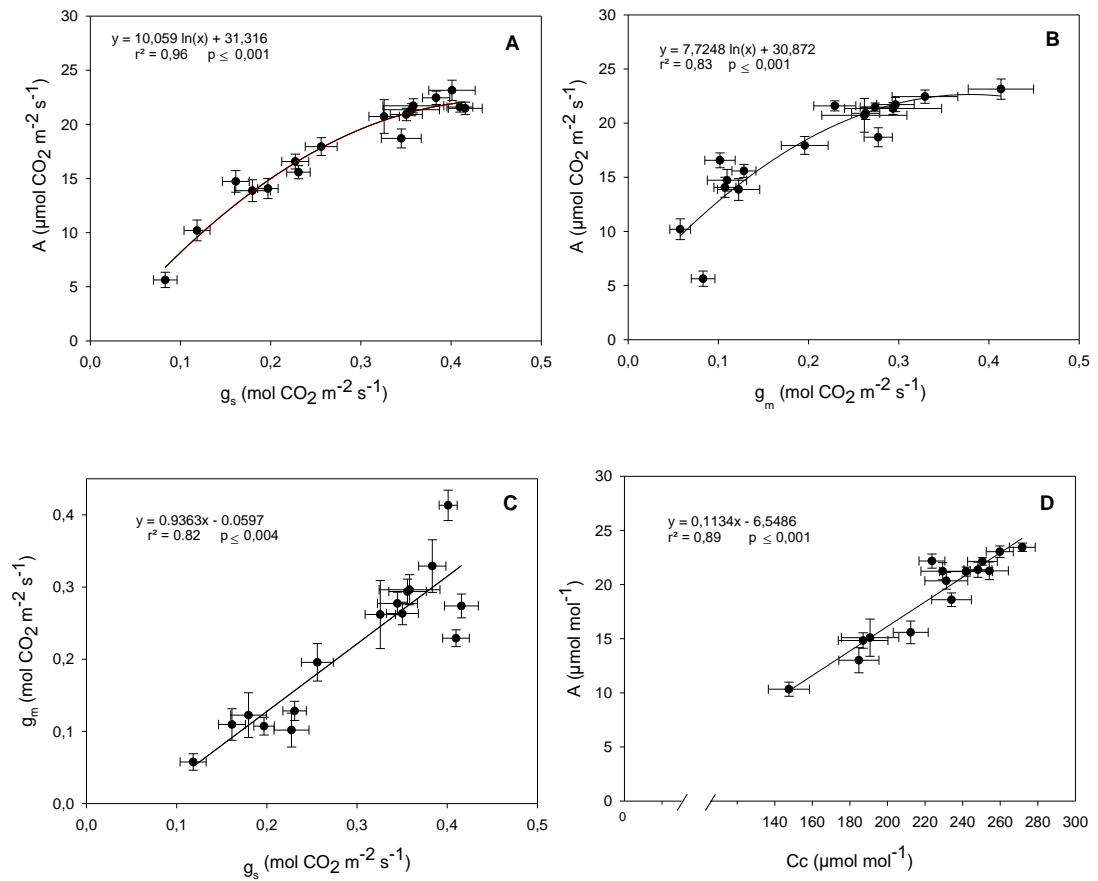
Parâmetros	Si	Fe	Si x Fe	Ct	Si x Ct	Fe x Ct	Si x Fe x Ct
Si na raiz	***	***/**	***	ns	ns	ns/***	ns
Si na folha	***	*/**	**/**	***	ns/**	ns/*	ns
Fe na raiz	*/**	***	*/**	***	ns	***	ns
Fe na folha	***	***	***	***	*/ns	***	**/*
A	***	***	*	ns/**	ns	ns/**	ns
$g_s$	***	***	*/ns	*/ns	ns	***/*	ns
$g_m$	***/ns	***	ns	ns	ns	ns	ns
LS	**/**	***	ns	*/ns	ns	**/*	ns
LM	***/ns	***	***/*	ns/**	*/ns	ns/***	**/ns
LB	***	***	***	ns/**	ns	*	ns/**
$V_{cmáx}$	ns	ns	ns	**/ns	ns/*	ns	ns
$J_{máx}$	ns/**	ns/*	ns/*	ns/**	ns	ns	ns
$J_o/J_c$	**/**	***	*	ns	ns	***/*	ns
$F_v/F_m$	ns	ns	ns/*	**/ns	ns	ns	ns/*
$F'_v/F'_m$	ns/*	***	**	ns	ns/*	ns	ns
$q_p$	ns	ns/**	ns	ns	ns	ns	ns

O impacto da toxidez de Fe no decréscimo de A foi parcialmente revertido pela adição de Si, como observado aos 8 e 15 DAAT na cultivar sensível, mas apenas aos 8 DAAT na cultivar tolerante (interação Si x Fe significativa). Resultados similares foram observados para  $g_s$  (Fig 2C-D) e  $g_m$  (Fig 2E-F). Com efeito, variações em A foram intimamente relacionadas com variações em  $g_s$  ( $r^2 = 0,96$ , Fig 3A) e  $g_m$  ( $r^2 = 0,83$ , Fig 3C).

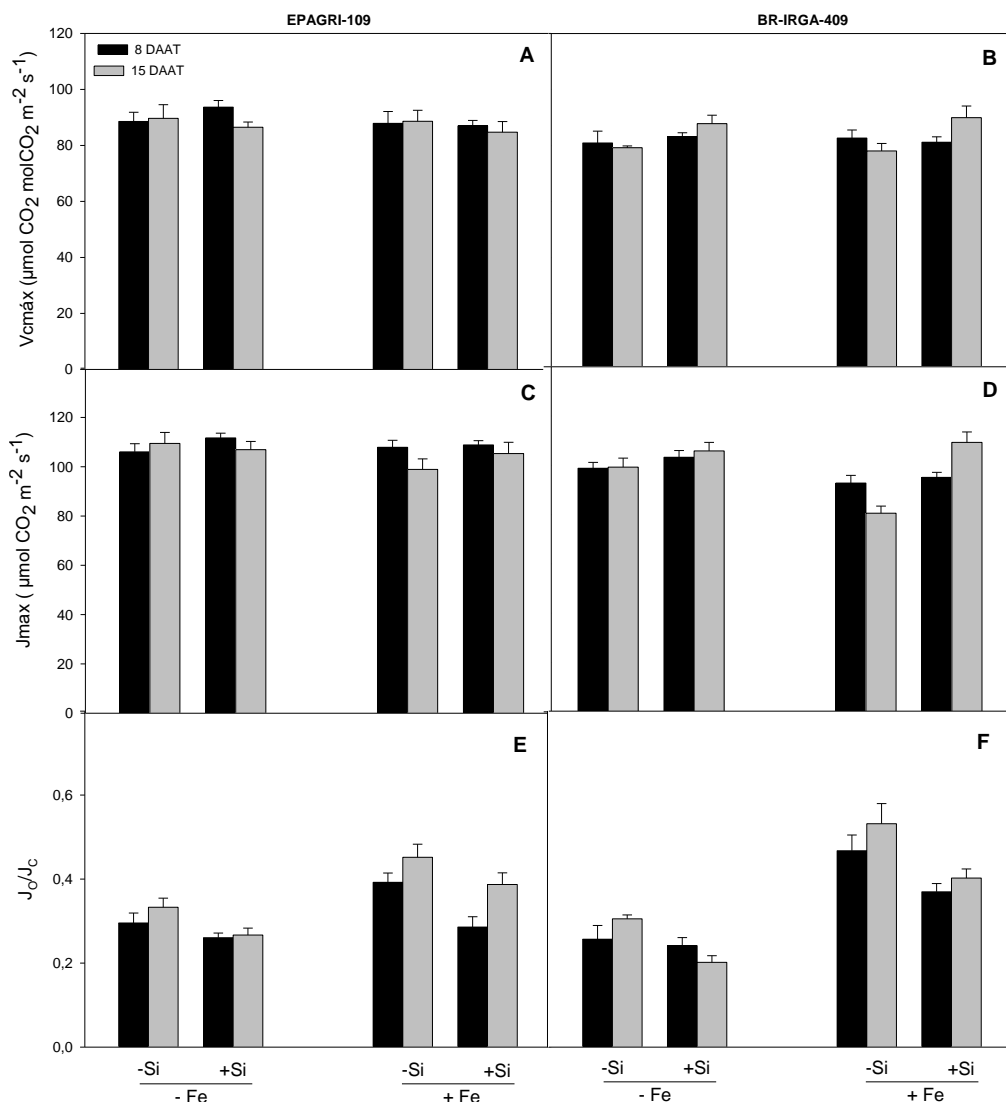
Registre-se que os impactos dos tratamentos aplicados sobre parâmetros fotoquímicos ( $F_v/F_m$ ,  $F'_v/F'_m$ ,  $q_p$ ) foram mínimos (Fig. 2 Suplementar), como também foram mínimos sobre  $V_{cmax}$  (Fig 4 A-B) e  $J_{max}$  (Fig 4 C-D). Por outro lado, houve efeitos do Si e do Fe (interação Fe x Si significativa) sobre a razão  $J_o/J_c$ , que aumentou mais marcadamente na cultivar sensível sob excesso de Fe, mas com menor magnitude quando o Si foi adicionado (Fig 4 E-F). Tomados em conjunto, os dados supracitados são consistentes com limitações difusionais em resposta aos tratamentos aplicados, e suportam a relação linear entre A e  $C_c$  ( $r^2=0,89$ , Fig 3D).



**Fig 2.** Efeitos do silício, Si (0 ou 2  $\text{mmol L}^{-1}$ : -Si ou +Si, respectivamente) e do ferro, Fe (25  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e 5  $\text{mmol L}^{-1}$ : -Fe e +Fe, respectivamente) na taxa líquida de assimilação de  $\text{CO}_2$ , A (A e B), condutância estomática,  $g_s$  (C e D) e condutância mesofílica,  $g_m$  (E e F), em duas cultivares de arroz [EPAGRI-109 e IRGA-409, tolerante e sensível a toxidez de Fe, respectivamente], cultivadas em solução nutritiva. Medições foram realizadas aos 8 e 15 dias após adição de Fe (DAAT).  $n = 12 \pm \text{SE}$  (valores de dois experimentos)



**Fig 3** – Relação entre a taxa líquida de assimilação de CO<sub>2</sub> (A), condutância estomática ao CO<sub>2</sub> (g<sub>s</sub>), condutância do mesofilo ao CO<sub>2</sub> (g<sub>m</sub>) e concentração cloroplastídica ao CO<sub>2</sub> (Cc): (A) A e g<sub>s</sub>, (B) A e g<sub>m</sub>; (C) g<sub>s</sub> e g<sub>m</sub>; A e Cc (D) n = 12 ± SE (valores de dois experimentos)

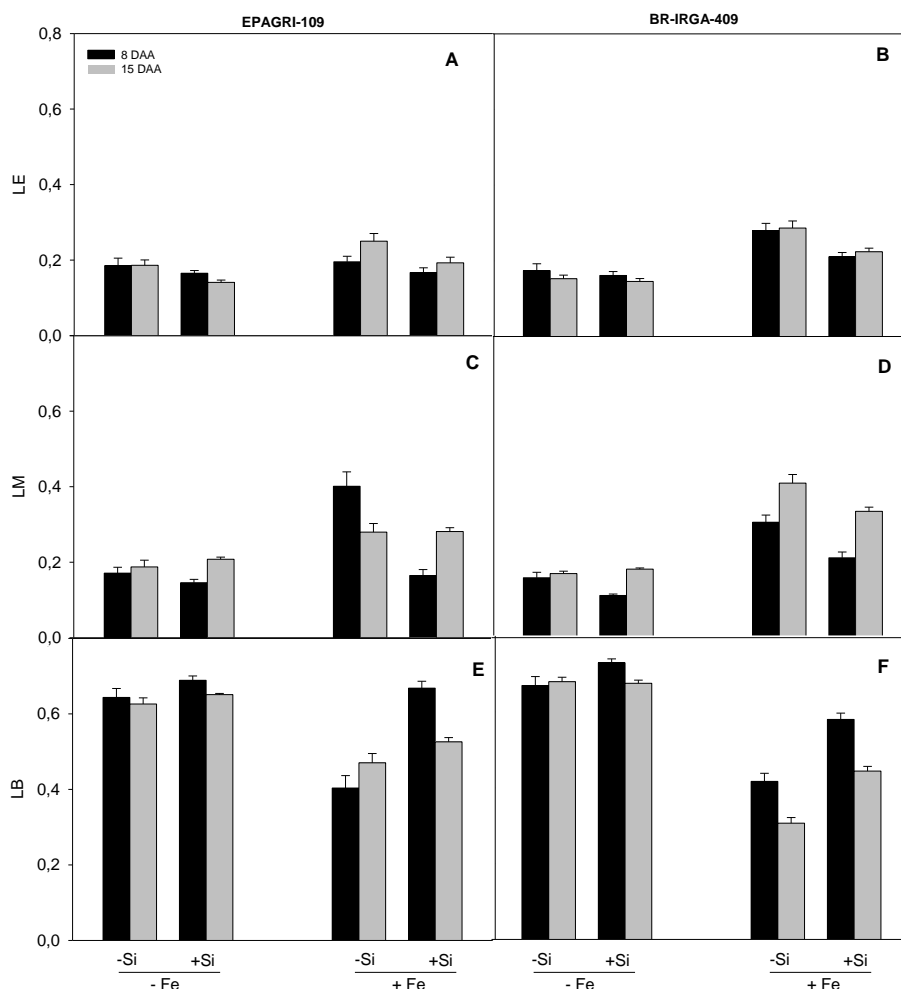


**Fig 4.** Os efeitos do silício, Si (0 ou 2 mmol L<sup>-1</sup> : -Si ou + Si, respectivamente) e ferro Fe (25 μM L<sup>-1</sup> e 50 mmol L<sup>-1</sup> : -Fe e +Fe, respectivamente), na velocidade máxima de carboxilação, V<sub>cmáx</sub> (A e B), taxa máxima de carboxilação limitada pelo transporte de elétrons, J<sub>máx</sub> (C e D) e a razão de transporte de elétrons destinados à taxa de oxigenação/carboxilação, J<sub>o</sub>/J<sub>c</sub> (E e F) em duas cultivares de arroz [EPAGRI-109 e BR-IRGA-409, tolerante e sensível a toxidez de Fe, respectivamente] cultivadas em solução nutritiva. Medições foram realizadas aos 8 e 15 dias após adição de Fe (DAAT). n= 12 ± SE (valores de dois experimentos).

### 3.3 Limitações à fotossíntese são impactadas pelo Si/Fe

Nas plantas controle (-Fe), os valores médios das limitações totais à fotossíntese foram de aproximadamente 16, 17 e 67% para as limitações estomática (LE), mesofílica (LM) e bioquímica (LB), respectivamente, independentemente da cultivar (Fig. 5). Porém, a aplicação do Fe promoveu alterações significativas nos componentes gerais dessas limitações. Sob excesso de Fe, LE foi reduzida, independentemente da cultivar e do tempo (interação significativa Fe x Ct), mas sem efeito

do Si (Tabela 1, Fig 5 A-B). Por outro lado, a toxidez por Fe acarretou aumento de LM nas cultivares, mas tal efeito foi parcialmente revertido pela adição de Si aos 8 DAAT na cultivar tolerante e aos 8 e 15 DAAT, na sensível (interações Si x Fe, Fe x Ct significativas). A LB, por sua vez, reduziu-se em resposta à toxidez de Fe, especialmente nas plantas -Si, independentemente da cultivar e do tempo de imposição do estresse por Fe (interação Si x Fe, Fe x Ct significativa). De fato, as cultivares do tratamento -Si +Fe apresentaram os menores valores de A ao longo do período experimental, sendo que o LE e LM foram responsáveis por aproximadamente 60% da limitação total à fotossíntese, em contraste com as plantas -Fe, cujas limitações difusionais (LE +LM) não passaram de 40% da limitação total à fotossíntese, independentemente da fertilização com Si.



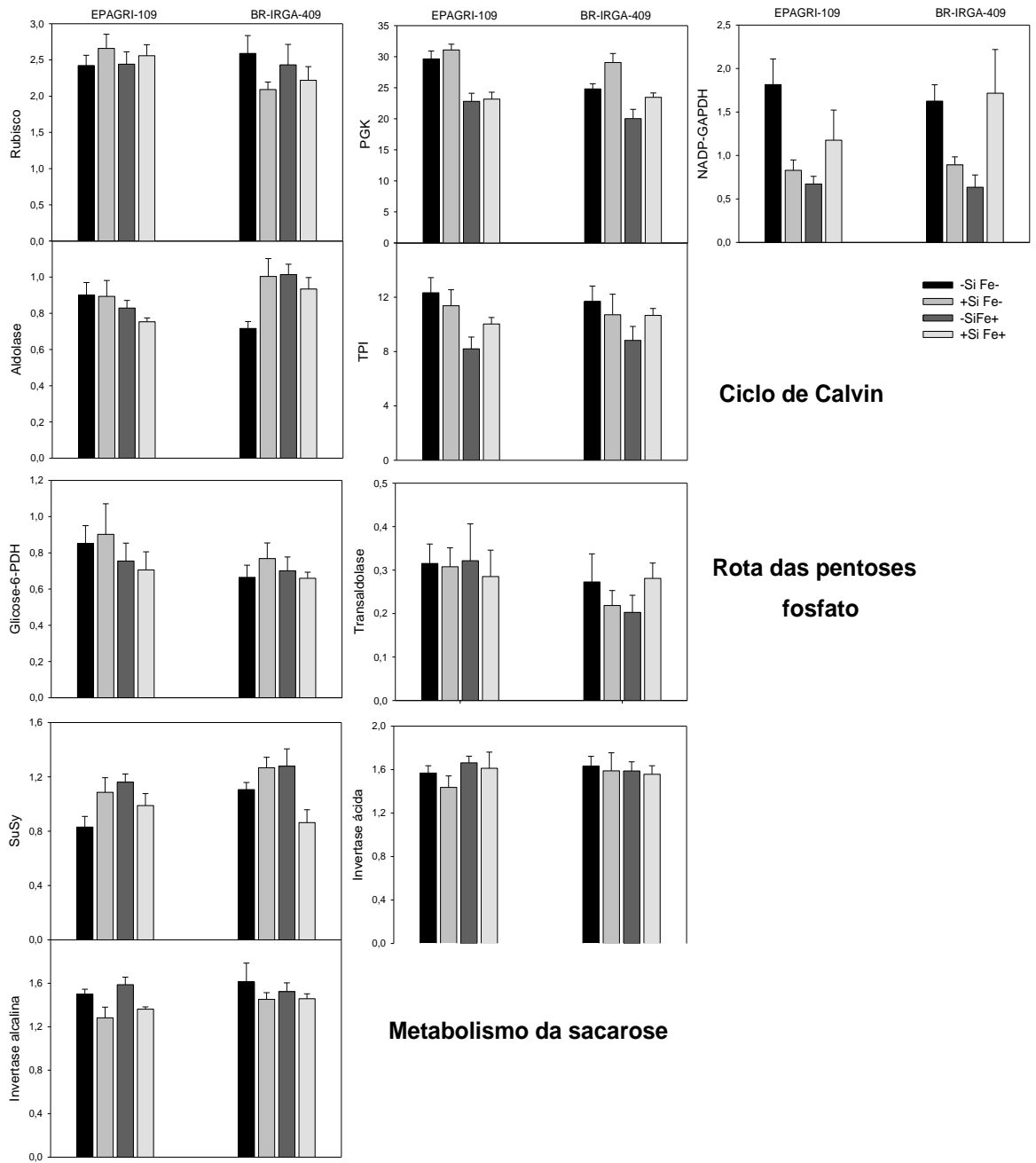
**Fig 5.** Efeitos do silício, Si (0 ou 2 mmol L<sup>-1</sup>: -Si ou +Si, respectivamente) e do ferro, Fe (25 μmol L<sup>-1</sup> e 5 mmol L<sup>-1</sup>: -Fe e +Fe, respectivamente) nos componentes das limitações fotossintéticas globais: limitações estomáticas, LE (A e B), limitações do mesófilo, LM (C e D) e limitações bioquímicas, LB (E e F), em duas cultivares de arroz [EPAGRI-109 e BR-IRGA-409, tolerante e sensível a toxidez de Fe, respectivamente] cultivadas em solução nutritiva. Medições foram realizadas aos 8 e 15 dias após adição de Fe (DAAT). n= 12 ± SE (dois experimentos).

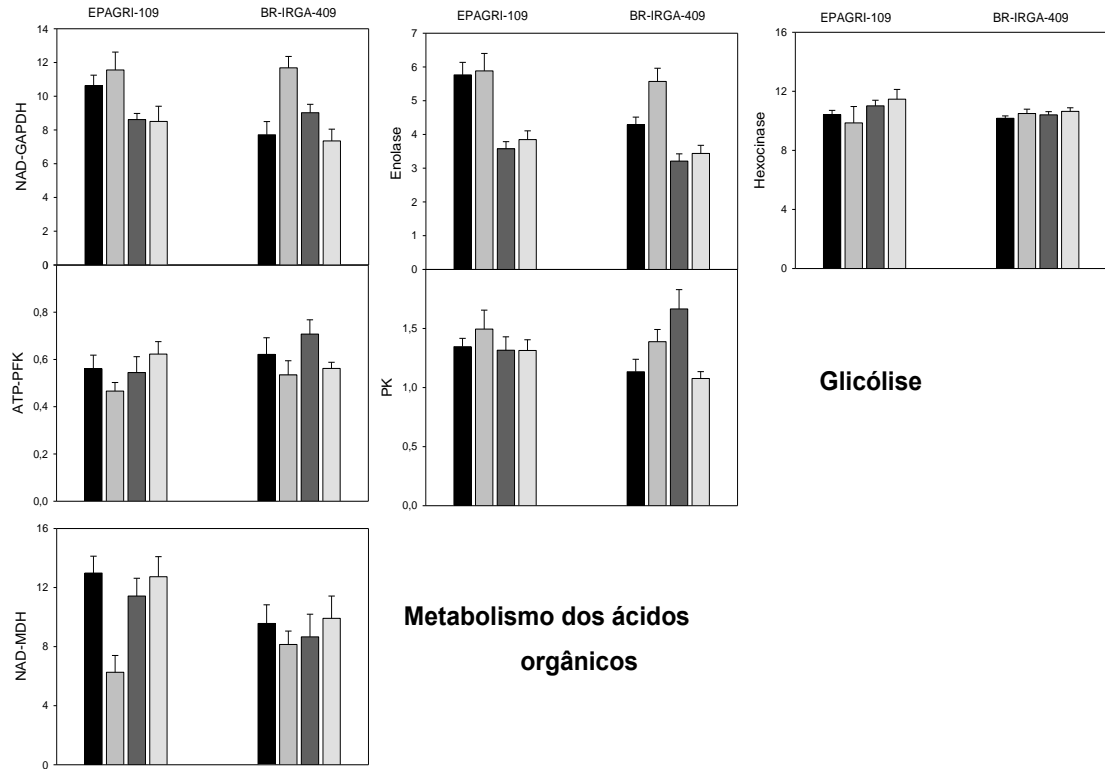
### 3.4 O metabolismo do carbono foi minimamente alterado pelos tratamentos aplicados

As enzimas associadas ao metabolismo do carbono, incluindo a RuBisCO, pouco ou nada responderam aos tratamentos aplicados. Das 16 enzimas analisadas, apenas três apresentaram redução na atividade catalítica nas plantas +Fe. Contudo, as amplitudes dessas mudanças foram relativamente pequenas e não permitem evidenciar o impacto direto do Fe ou um efeito mitigatório do Si no metabolismo central (Fig. 6).

**Tabela 2.** Resultado da ANOVA (ns = não significativo; \*P< 0.05; \*\*P <0.01; \*\*\*P<0.001) para os efeitos do silício (Si), Ferro (Fe) e cultivar (Ct) e suas interações para as concentrações de Si e Fe para atividade das enzimas do metabolismo do carbono, razões dos nucleotídeos, carboidratos, proteínas, malato e fumarato aos 8 dias após aplicação do estresse (DAAT)

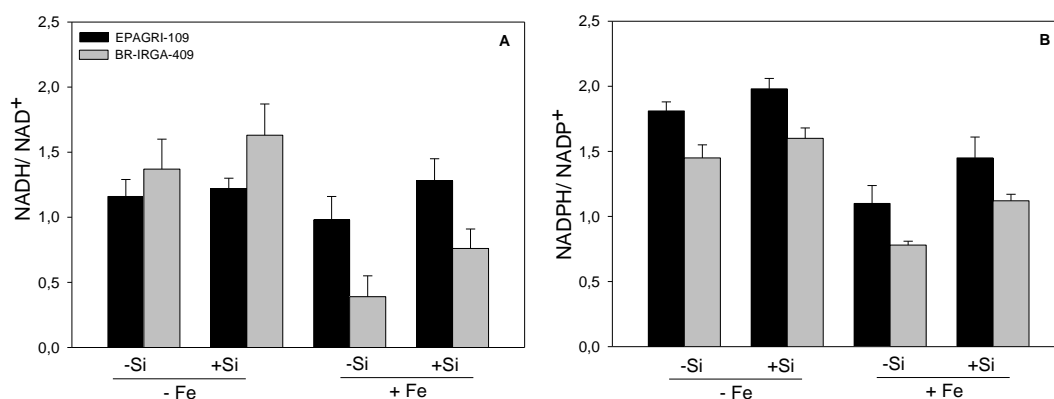
Parâmetros	Si	Fe	Si x Fe	Ct	Si x Ct	Fe x Ct	Si x Fe x Ct
Rubisco	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
PGK	**	***	ns	**	ns	ns	ns
GAPDH (NADP)	ns	ns	***	ns	ns	ns	ns
Aldolase	ns	ns	*	ns	ns	*	ns
TPI	ns	ns	**	ns	ns	ns	ns
Glicose-6-PDH	ns	ns	ns	**	ns	ns	ns
Transaldolase	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
SUSY	ns	ns	**	ns	ns	ns	ns
Invert. Ácida	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Invert. Alcalina	**	ns	ns	ns	ns	ns	ns
GAPDH (NAD)	ns	***	***	ns	ns	ns	*
Enolase	*	***	ns	**	ns	ns	ns
Hexocinase	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
ATP-PFK	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
PK	ns	ns	**	ns	ns	ns	**
MDH (NAD)	ns	ns	**	*	ns	ns	ns
NADH/NAD <sup>+</sup>	ns	***	ns	ns	ns	***	ns
NADPH/NADP <sup>+</sup>	**	***	ns	**	*	ns	ns
Glicose	***	***	**	***	ns	***	**
Frutose	**	***	***	***	ns	ns	*
Sacarose	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Amido	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Proteínas	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Aminoácido	ns	ns	*	ns	ns	*	**
Malato	***	***	ns	****	***	ns	ns
Fumarato	***	***	ns	****	*	ns	ns





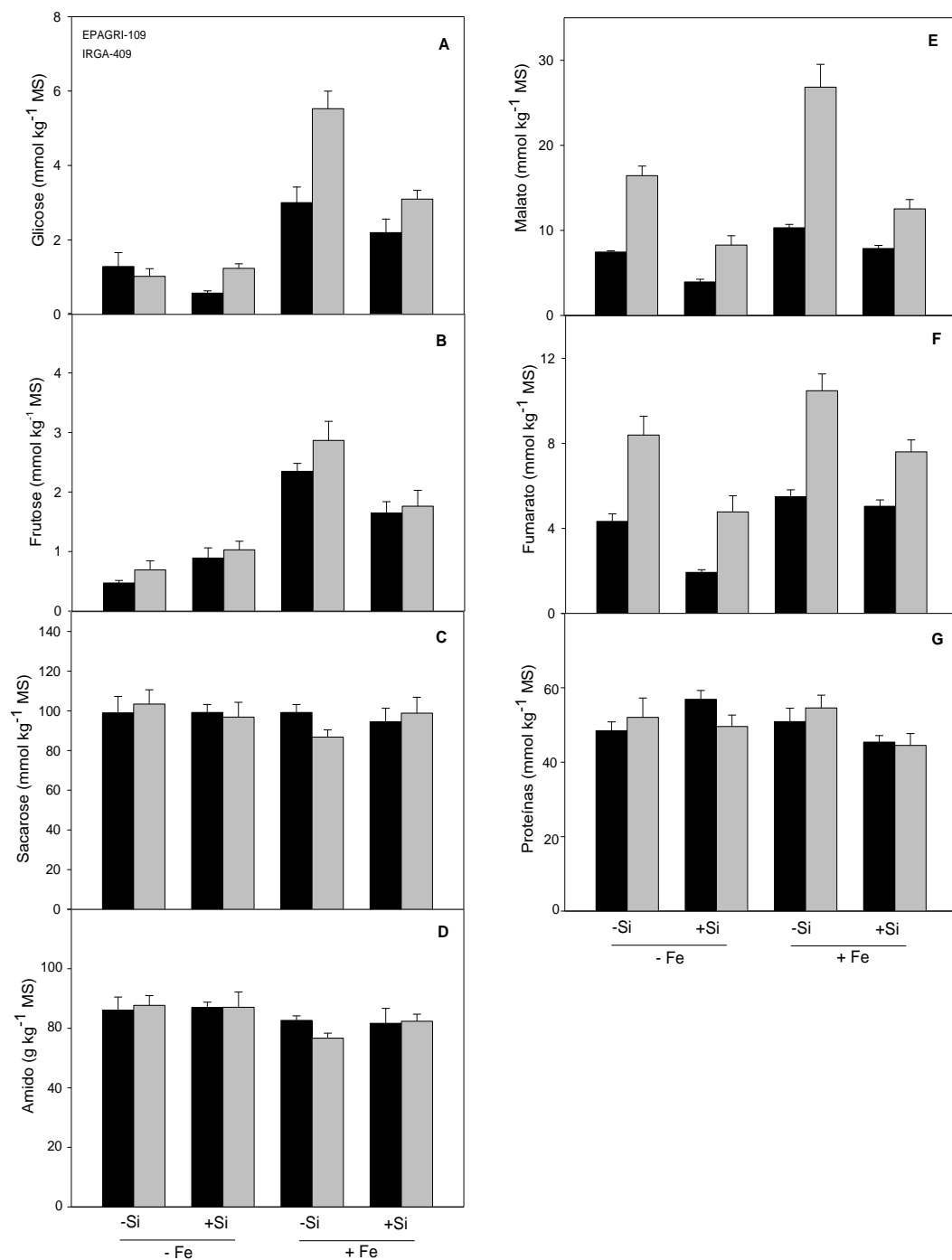
**Fig. 6** - Os efeitos do silício, Si (0 ou 2 mmol L<sup>-1</sup>: -Si ou + Si, respectivamente), e ferro (25 µmol L<sup>-1</sup> e 5 mmol L<sup>-1</sup>: -Fe e +Fe, respectivamente), sobre as atividades de enzimas (expressas como µmol min<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> MF) associadas a algumas vias do metabolismo do carbono nas cultivares de arroz [EPAGRI-109 e BR IRGA-409, tolerante e sensível a toxidez de Fe, respectivamente] cultivadas em solução nutritiva. As medições foram realizadas aos 8 após a adição de Fe (DAAT). n = 6 ± SE. Ver tabela no anexo I para detalhes sobre as abreviaturas.

As razões NADH/NAD<sup>+</sup> e NADPH/NADP<sup>+</sup> foram reduzidas nas plantas do tratamento -Si+Fe em 24% e 30% na cultivar sensível e 23% e 49% na tolerante, respectivamente quando comparadas àquelas das plantas do tratamento do +Si+Fe, tendo ainda diferença entre a resposta das cultivares para a razão NADH/NAD<sup>+</sup> sob excesso de Fe (interação Fe x Ct significava). Registre-se que não houve interação Si x Fe significativa sobre essas razões (Fig 7).



**Fig 7.** Os efeitos do silício, Si (0 ou 2 mmol L<sup>-1</sup>: -Si ou + Si, respectivamente) e ferro, Fe (25 µmol L<sup>-1</sup> e 5 mmol L<sup>-1</sup>: -Fe e + Fe, respectivamente), sobre a razão NADH/NAD<sup>+</sup> (A) e NADPH/NADP<sup>+</sup> (D), em folhas de duas cultivares de arroz (EPAGRI-109 e BR-IRGA-409, tolerante e sensível a toxidez de Fe) cultivadas em solução nutritiva. Medições foram realizadas aos 8 dias após adição de Fe (DAAT). n = 5-6 ± SE

As concentrações de glicose e frutose aumentaram significativamente nas plantas +Fe de ambas cultivares (interações Si x Fe, Fe x Ct significativas), mais marcadamente nas plantas -Si (Tabela 2, Fig 8 A-B). Por outro lado, as concentrações de sacarose, amido e proteínas não foram afetadas pelos tratamentos (Tabela 2 e Fig. 8 C-D). A toxidez por Fe favoreceu o aumento nas concentrações de malato e fumarato, sendo o efeito mais evidente na cultivar sensível, porém a fertilização com Si acarretou reduções nessas concentrações, independentemente da cultivar (interações Si x Fe, Si x Ct significativas).



**Fig. 8.** Os efeitos do silício, Si (0 ou 2mmol L<sup>-1</sup>: -Si ou + Si, respectivamente) e ferro, Fe (25 μmol L<sup>-1</sup> e 5 mmol L<sup>-1</sup>: -Fe e + Fe, respectivamente), sobre as concentrações de glicose (A), frutose (B), sacarose (C), amido (D), malato (E), fumarato (F) aminoácidos (G) e proteínas (H) em folhas duas cultivares de arroz (EPAGRI-109 e BR-IRGA-409, tolerante e sensível na toxicidade de Fe) cultivadas em solução nutritiva. Medições foram realizadas aos 8 dias após adição de Fe (DAAT). n = 6 ± SE

#### 4. DISCUSSÃO

Os teores de Fe nas folhas e raízes das cultivares BR-IRGA-409 (sensível) e EPAGRI-109 (tolerante) submetidos a 5 mM L<sup>-1</sup>, em solução nutritiva, foram superiores aos níveis considerados como críticos de toxicidade ( $\geq 300\text{-}500\text{ mg kg}^{-1}$  de massa seca) (Dobermann e Fairhurst, 2000). Isso impactou negativamente a fotossíntese em ambas cultivares, porém com resposta mais evidente na cultivar sensível, que apresentou o maior acúmulo de Fe nas folhas. Por outro lado, a fertilização com Si, ao diminuir o teor de Fe nos tecidos, em ambas cultivares, concorreu para reverter, parcialmente, as consequências da toxidez de Fe, a julgar-se pelo desempenho fotossintético na cultivar sensível ao Fe, em conformidade com a hipótese deste estudo. Note-se ainda que o Si, diretamente, não impactou a taxa fotossintética líquida (A) nas plantas -Fe, a exemplo do observado em outros estudos em que o Si não resultou em alterações em A em plantas de arroz durante o estágio vegetativo (Detmann et al, 2012; Sanglard et al, 2014).

A redução de A em cultivares de arroz sob o excesso de Fe vem sendo atribuída a decréscimo em  $g_s$  (Pereira et al, 2013; Müller et al, 2015; Pinto et al, 2016). Neste estudo, demonstrou-se que não apenas  $g_s$ , mas também  $g_m$ , limita a difusão do CO<sub>2</sub>, desde a atmosfera até os cloroplastos, em resposta ao excesso de Fe. Estes resultados sugerem uma intrínseca correlação entre essas condutâncias, conforme proposto por Flexas et al (2008) e Flexas et al (2012), a despeito dos níveis foliares de Fe. Resultados similares têm sido obtidos em arroz em resposta ao arsênio (Sanglard et al, 2014) e em beterraba em resposta ao zinco (Sagardoy et al, 2010). Conquanto a capacidade fotoquímica e bioquímica para fixação de CO<sub>2</sub> foram preservadas sob excesso de Fe, sugere-se as reduções em A ora observadas foram fundamentalmente associadas a fatores difusivos.

A redução da condutância foliar ( $g_s + g_m$ ) em resposta ao excesso de Fe (Fig 2) foi parcialmente revertido pela fertilização com Si. A reversão desses impactos dependeu do tempo e da exposição ao excesso de Fe, sendo mais evidente aos 8 que aos 15 DAAT, possivelmente em função de os níveis de Fe terem sido incrementado com o tempo, a despeito da cultivar. As concentrações foliares de Si também aumentaram com o tempo, porém, proporcionalmente menos que as concentrações de Fe, conforme se deduz dos dados apresentados na Fig 1. Tomados em conjunto, estes resultados sugerem que os efeitos mitigatórios do Si sobre o excesso de Fe poderiam

estar associados não somente à redução dos níveis de Fe nas plantas +Si, mas também a algum efeito direto do Si sobre  $g_s$  e/ou  $g_m$ . Embora os mecanismos fisiológicos associados a esses efeitos não tenham sido estabelecidos, algumas evidências sugerem que o Si pode impactar diretamente a fotossíntese por modular  $g_s$  (Lavinsky et al, 2016) ou  $g_m$  (Detmann et al, 2012) em plantas de arroz na fase reprodutiva em condições não-estressantes. Em conformidade com essas informações, as limitações bioquímicas, que responderam por mais de 60% das limitações totais à fotossíntese nas plantas -Fe, decresceram para menos de 40%, com correspondentes incrementos nas limitações difusionais em resposta ao excesso de Fe.

O impacto do Fe na redução de  $A$ , em ambas as cultivares, poderia estar relacionado inicialmente a alterações na etapa fotoquímica da fotossíntese, devido a relação integrada dos processos. Entretanto, a análise dos parâmetros de fluorescência da Chl  $a$  demonstrou variações mínimas entre os tratamentos e o tempo de exposição ao Fe. Registre-se que a manutenção da eficiência fotoquímica máxima ( $F_v/F_m$ ) e efetiva ( $F'_v/F'_m$ ) do fotossistema II (PSII) sob excesso de Fe, observada em ambas as cultivares foi acompanhada de reduções nas razões  $NADH/NAD^+$  e  $NADPH/NADP^+$ , a despeito das reduções em  $A$ . Isto sugere que rotas alternativas de dissipação de energia podem ter sido estimuladas sob excesso de Fe. Nesse contexto, o aumento da razão  $J_o/J_c$  é um indicativo de incrementos da taxa de fotorrespiração, um processo tido como alternativo para dissipar o fluxo excessivo de elétrons e evitar a fotoinibição da fotossíntese (Wingler et al, 2000). Outros mecanismos de dissipação de energia, tais como o ciclo água-água (Asada, 2000) ou fluxo cíclico de elétrons (Heber, 2002), poderiam também explicar as reduções observadas nas razões  $NADH/NAD^+$  e  $NADPH/NADP^+$ .

O acúmulo de metabólitos como as hexoses (glicose e frutose) é comumente observado em condições de estresse abiótico, embora varie com o tempo e a extensão do estresse imposto (Radomiljac et al, 2013), como aqui observado sob toxidez por Fe. Com efeito, estudos em *Arabidopsis thaliana* sob diferentes fatores de estresses abióticos demonstram que os níveis de açúcares aumentam substancialmente (Rizhsky et al, 2004; Kaplan et al, 2007; Hummel et al, 2010), o que normalmente é relacionado com osmorregulação, estabilização/proteção de membrana, fornecimento de substrato para a respiração e balanço de carbono para o crescimento (Rizhsky et al, 2004; Rosa et al, 2009; Hummel et al, 2010). Além disso, o acúmulo de ácidos orgânicos (malato e fumarato) em ambas as cultivares sob excesso de Fe pode estar relacionado ao

funcionamento não-cíclico do ciclo TCA, bem como ao equilíbrio no balanço redox na célula (Hummel et al, 2010; Igamberdiev e Eprintsev, 2016). Apesar das alterações em A e nos teores de hexoses (malato e fumarato – cujas concentrações usualmente se alteram em conformidade com o balanço de carbono), não se observaram quaisquer variações nos teores de sacarose e de amido. Conforme se deduz na Fig 7, os níveis de hexoses foram expressivamente inferiores aos de sacarose + amido, concorrendo para uma constância das concentrações de carboidratos não-estruturais. Esse fato pode estar associado com a menor demanda de assimilados nas plantas +Fe, que normalmente acumulam menos biomassa que suas contrapartes sem excesso de Fe (Capítulo 3).

Em conclusão, foi demonstrado no presente trabalho que a fertilização com Si em cultivares de arroz sob excesso de Fe promove a reversão parcial dos efeitos tóxicos do Fe na fotossíntese, ao reduzir o acúmulo de Fe nos tecidos foliares. O menor teor de Fe nas plantas +Si foi associado a menores reduções de  $g_s$  e  $g_m$ , concorrendo, por conseguinte, para mitigar os impactos negativos do excesso de Fe sobre A nas plantas +Si+Fe. Enfatize-se que a toxidez por Fe e/ou a fertilização com Si afetaram minimamente os parâmetros fotoquímicos e bioquímicos da fotossíntese, bem como as enzimas do metabolismo central do carbono, sugerindo notável homeostase metabólica e reforçando a importância de aspectos difusionais em relação aos bioquímicos no controle de A, em condições de toxidez por Fe.

## 5. REFERÊNCIAS

- Audebert, A.; Fofana, M.** Rice Yield Gap due to Iron Toxicity in West Africa. *Journal Agronomy & Crop Science*, 195: 66–76, 2009.
- Asada, K.** The water–water cycle as alternative photon and electron sinks. *Philosophical Transactions of the Royal Society London B: Biological Science*, 355: 1419-1431, 2000.
- Asch, F.; Becker F.; Kpongor, M.** A quick and efficient screen for resistance to iron toxicity in lowland rice. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 168: 764-773, 2005.
- Bradford M.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254, 1976.
- Chalmardi, Z.C.; Abdolzadeh, A.; Sadeghipour, H.K.** Silicon nutrition potentiates the antioxidant metabolism of rice plants under iron toxicity. *Acta Physiologiae Plantarum*, 36:493–502, 2014.
- Chika, C. N.; Huerta, A. J.** Effects of silicon nutrition on cadmium uptake, growth and photosynthesis of rice plants exposed to low-level cadmium. *Plant and Soil*, 311:73–86, 2008.
- Dallagnol, L.J.; Rodrigues F.A.; DaMatta, F.M.; Mielli, M.V.B.; Pereira, S.C.** Deficiency in silicon uptake affects cytological, physiological, and biochemical events in the rice *Bipolaris oryzae* interaction. *Phytopathology*, 101:92-104, 2011.
- Detmann, K. C.; Araújo, W. L.; Martins, S. C. V.; Sanglard, L. M.V.P.; Reis, J. V.; Detmann, E.; Rodrigues, F. A; Nunes-Nesi, A.; Fernie, A. R.; DaMatta, F. M.** Silicon nutrition increases grain yield, which, in turn, exerts a feed-forward stimulation of photosynthetic rates via enhanced mesophyll conductance and alters primary metabolism in rice. *New Phytologist* 196: 752-762, 2012.
- Detmann, K.C.; Araújo, W.L.; Martins, C.V.; Fernie, A.R.; DaMatta, F.M.** Metabolic alterations triggered by silicon nutrition Is there a signaling role for silicon? *Plant Signaling & Behavior* 8:1, e22523, 2013.
- Dobermann, A.; Fairhurst, T.** Rice: nutrient disorders and nutrient management. Manila: International Rice Research Institute, 2000. 191 p.
- Dufey, S. G.; Ingabire, A.; Lutts, S.; Bertin, P.** Silicon application in cultivated rices (*Oryza sativa* L and *Oryza glaberrima* Steud) alleviates iron toxicity symptoms through the reduction in iron concentration in the leaf tissue. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 200: 132–142, 2014.
- Exley, C.** Silicon in life: A bioinorganic solution to bioinorganic essentiality. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 69: 139-144, 1998.

**Farquhar, G. D.; von Caemmerer, L.; Berry, J. A.** A biochemical model of photosynthetic CO<sub>2</sub> assimilation in leaves of C<sub>3</sub> species. *Planta*, 149: 78 - 90, 1980.

**Fernie, A.R.; Roscher, A.; Ratcliffe, R.G.; Kruger, N.J.** Fructose 2,6- bisphosphate activates pyrophosphate: fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase and increases triose phosphate to hexose phosphate cycling in heterotrophic cells. *Planta* 212, 250-263, 2001.

**Flexas J.; Ribas-Carbó M.; Díaz-Espejo A.; Galmés, J.; Medrano H.** Mesophyll conductance to CO<sub>2</sub>: current knowledge and future prospects. *Plant, Cell & Environment* 31: 602–621, 2008.

**Flexas, J.; Barbour, M.M.; Brendel, O.; Cabrera, H.M.; Carriqui, M., Díaz-Espejo, A.; Douthe, C.; Dreyer, E.; Ferrio, J.P.; Gago, J.; Gallé, A.; Galmés, J., Kodama, N.; Medrano, H.; Niinemets, U.; Peguero-Pina, J.J.; Pou, A.; Ribas-Carbó, M.; Tomás, M.; Tosens, T.; Warren, C.R.** Mesophyll diffusion conductance to CO<sub>2</sub>: An unappreciated central player in photosynthesis. *Plant Science*. 193: 70–84, 2012.

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

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

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

**Harley, P. C.; Loreto, F.; Di Marco, G.; Sharkey, T. D.** Theoretical considerations when estimating mesophyll conductance to CO<sub>2</sub> flux by analysis of the response of photosynthesis to CO<sub>2</sub>. *Plant Physiology*, 98: 1429-1436, 1992.

**Heber, U.; Bulhov, N. G.; Shvalov, V.A.; Kobayashi, Y.; Lange, O.L.** Protection of the photosynthetic apparatus against damage by excessive illumination in homoiohydric leaves and poikilohydric mosses and lichens. *Journal of Experimental Botany*, 363:199-2006, 2001.

**Hummel L-1 el, I.; Pantin, F.; Sulpice, R.; Piques, M.; Rolland, G.; Dauzat, M.; Dauzat, M.; Christophe, A.; Pervent, M.; Bouteillé, M.; Stitt, M.; Gibon, Y.; Müller, B.** Arabidopsis plants acclimate to water deficit at low cost through changes of carbon usage: an integrated perspective using growth, metabolite, enzyme, and gene expression analysis. *Plant Physiol.* 154: 357-372, 2010.

**Hoagland, D.R.; Arnon, D. I.** The water culture method for growing plants without soils. Berkeley: California Agricultural Experimental Station, 347 p., 1950.

**Igamberdiev, A.U.; Eprintsev, A.T.** Organic Acids: The Pools of Fixed Carbon Involved in Redox Regulation and Energy Balance in Higher Plants. *Front. Plant Science*. 7:1042, 2016.

**Jenner, H.L.; Winning, B.M.; Millar, A.H.; Tomlinson, K.L.; Leaver, C.J.; Hill, S.A.** NAD malic enzyme and the control of carbohydrate metabolism in potato tubers. *Plant Physiology*. 126, 1139-1149, 2001.

**Kaplan, F.; Kopka, J.; Sung, D.Y.; Zhao, W.; Popp, M.; Porat, R.; Guy, C.L.** Transcript and metabolite profiling during cold acclimation of Arabidopsis reveals an intricate relationship of cold-regulated gene expression with modifications in metabolite content. *The Plant Journal*, 50: 967–981, 2007.

**Lavinsky, A.O.; Detmann, K.C.; Reis, J.V.; Ávila, R.T.; Sanglard, M.L.; Pereira, L.F.; Sanglard, L.M.V.P.; Rodrigues, F. A.; Araújo, W. L.; DaMatta, F.M.** Silicon improves rice grain yield and photosynthesis specifically when supplied during the reproductive growth stage. *Journal of Plant Physiology* 206:125–132, 2016.

**Liang, Y.; Yang, C.; Shi, H.** Effects of silicon on growth and mineral composition of barley grown under toxic levels of aluminium. *Journal of Plant Nutrition*, New York, 24: 229-242, 2001.

**Lichtenthaler, H.K.** Chlorophylls and carotenoids: pigment photosynthetic biomembranes. *Methods Enzymol.*, San Diego, 148:362-385, 1987.

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

**Ma, J.F.; Yamaji, N.; Mitani, N.; Tamai, K., Tamai, K.; Katsuhara, M.; Yano, M.** An efflux transporter of silicon in rice. *Nature*, 448: 209-213, 2007.

**Malavolta, E.; Vitti, G. C.; Oliveira, S. A.** Evaluation of the nutritional state of plants: principles and applications. Potafos, Piracicaba pp. 201, 1989.

**Müller, C.; Kuki, K, N.; Pinheiro, D.T.; Souza, L.R.S.; Silva, A.I.S.; Loureiro, M.E.; Oliva, M.A.; Almeida, A.M.** Differential physiological responses in rice upon exposure to excess distinct iron forms. *Plant and Soil*, 391: 123-138, 2015.

**Nunes-Nesi, A.; Carrari, F.; Gibon, Y.; Sulpice, R.; Lytovchenko, A.; Fisahn, J.; Graham, J.; Ratcliff, R.G.; Sweetlove, L.J.; Fernie, A.R.** Deficiency of mitochondrial fumarase activity in tomato plants impairs photosynthesis via an effect on stomatal function. *Plant Journal*. 50, 1093-1106, 2007.

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

**Pereira, E.G.; Oliva, M. A.; Rosado-Souza, L.; Mendes, G. C.; Colares, D, S.; Stopato, C. H.; Almeida, A. M.** Iron excess affects rice photosynthesis through stomatal and non-stomatal limitations. *Plant Science*, 81-89, 2013.

**Pereira, E.G.; Oliva, M.A.; Siqueira-Silva, A.I.; Rosado-Souza, L.; Pinheiro, D.T.; Almeida, A.M.** Tropical Rice Cultivars from Lowland and Upland Cropping Systems Differ in Iron Plaque Formation. *Journal of Plant Nutrition*. 37:1373–1394, 2014

**Pinto, S.S.; Souza, A.E.; Oliva, M.A.; Pereira, E.G.** Oxidative damage and photosynthetic impairment in tropical rice cultivars upon. *Scientia Agricola*. 73: 217-226, 2016.

**Praxedes, S.C., DaMatta, F.M., Loureiro, M.E., Ferrão, M.A.G., Cordeiro, A.T.** Effects of long-term soil drought on photosynthesis and carbohydrate metabolism in mature robusta coffee (*Coffea canephora* Pierre var. kouillou) leaves. *Environmental and Experimental Botany* 56: 263-273, 2006

**Radomiljac, J. D.; Whelan, J.; Merwe, M. V. D.** Coordinating metabolite changes with our perception of plant abiotic stress responses: emerging views revealed by integrative- Omic Analyses. *Metabolites*, 3:761-786,2013

**Ricachenevsk, F. K.; Sperotto, R.A.; Menguer, P.K.; Fett, J.P.** Identification of Fe-excess-induced genes in rice shoots reveals a WRKY transcription factor responsive to Fe, drought and senescence. *Molecular Biology Reporters*, 37: 3735–3745, 2010.

**Rizhsky, L.; Liang, H.; Shuman, J.; Shulaev, V.; Davletova, S.; Mittler, R.** When defense pathways collide. The response of Arabidopsis to a combination of drought and heat stress. *Plant Physiology*, 134: 1683–1696, 2004.

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

**Ronchi, C.P.; DaMatta, F.M.; Batista, K.D.; Moraes, G.A.B.K.; Loureiro, M.E.; Ducatti, C.** Growth and photosynthetic down-regulation in *Coffea arabica* in response to restricting root volume. *Functional Plant Biology* 33, 1013-1023, 2006.

**Rosa, M.; Prado, C.; Podazza, G.; Interdonato, R.; González, J. A.; Mirna, H.; Prado, F. E.** Soluble sugars—Metabolism, sensing and abiotic stress. A complex network in the life of plants. *Plant Signaling & Behavior* 4:5, 388-393, 2009.

**Sanglard, L. M.V.P.; Martins, S. C. V.; Detmann, K. C., Silva, P.E.M.; Lavinsky, A.O.; Silva, M.M.; Detmann, E., Araújo, W. L.; DaMatta, F. M.** Silicon nutrition alleviates the negative impacts of arsenic on the photosynthetic apparatus of rice leaves: an analysis of the key limitations of photosynthesis. *Physiologia Plantarum*, 152: 355-366, 2014.

**Sanglard, L. M.V.P.; Detmann, K. C.; Martins, S. C. V.; Teixeira, R. A.; Pereira, L. F.; Sanglard, M.L.; Fernie, A. R.; Araújo, W. L.; DaMatta, F. M.** The role of

silicon in metabolic acclimation of rice plants challenged with arsenic. *Environmental and Experimental Botany*. 123: 22-36, 2016.

**Sagardoy, R. Vázquez, S.; Florez-Sarasa, I.D.; Albacete, A.; Ribas-Carbó, M.; Flexas, J. Abadía, J.; Molares, F.** Stomatal and mesophyll conductances to CO<sub>2</sub> are the main limitations to photosynthesis in sugar beet (*Beta vulgaris*) plants grown with excess zinc. *New phytologist* 187:145-158, 2010.

**SAS INSTITUTE.** SAS user's guide: statistics, version 9.1. Cary: SAS Institute, 2002.

**Silveira, C.V.; Oliveira, A.P.; Sperotto, R.A.; Espindola, L.S.; Amaral, L.; Dias, J.F.; Cunha, J.B.; Fett, J.P.** Influence of iron non mineral status of two rice (*Oryza sativa* L.) cultivars. *Brazilian Journal Plant Physiology*, 19:127-139, 2007.

**Stein, R.J.; Duarte, G.L.; Spohr, M.G.; Lopes, S.I.G.; Fett, J.P.** Distinct physiological responses of two rice cultivars subjected to iron toxicity under field conditions. *Annals of Applied Biology*, 154: 269-277, 2009.

**Stein, R.J.; Lopes, S.I.G.; Fett, J.P.** Iron toxicity in field-cultivated rice: contrasting tolerance mechanisms in distinct cultivars. *Theoretical and Experimental Plant Physiology*. 26: 135-146, 2014.

**Song, A.; Li, P.; Fan, F.; Li, Z.; Liang, Y.** The Effect of Silicon on Photosynthesis and Expression of Its Relevant Genes in Rice (*Oryza sativa* L.) under High-Zinc Stress. *Plos One*, 26: 1-21, 2014.

**Sommol L-1 er, M.; Kaczrek, D.; Kuzyakov, Y.; Breuer, J.;** Silicon pools and fluxes in soils and landscapes – a review. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*. 169: 310–329, 2006.

**Sharkey, T. D.; Bernacchi, C. J.; Farquhar, G. D.; Singaas, E. L.** Fitting photosynthetic carbon dioxide response curves for C<sub>3</sub> leaves. *Plant, Cell and Environment* 30: 1035-1040, 2007.

**Valentini, R.; Epron, D.; Angelis, P.; Matteucci, G.; Dreyer, E.** In situ estimation of net CO<sub>2</sub> assimilation, photosynthetic electron flow and photorespiration in Turkey oak (*Q. cerris* L.) leaves: diurnal cycles under different levels of water supply. *Plant, Cell & Environment* 18: 631–640, 1995.

**Velikova, V.; Tsonev, T.; Loreto, F.; Centritto, M.** Changes in photosynthesis, mesophyll conductance to CO<sub>2</sub>, and isoprenoid emissions in *Populus nigra* plants exposed to excess nickel *Environmental Pollution* 159: 1058-1066, 2011.

**Vigani, G., Zocchi, G., Bashir, K., Philippar, K., Briat, J.F.** Signals from chloroplasts and mitochondria for iron homeostasis regulation. *Trends in Plant Science*, 18: 305-311, 2013.

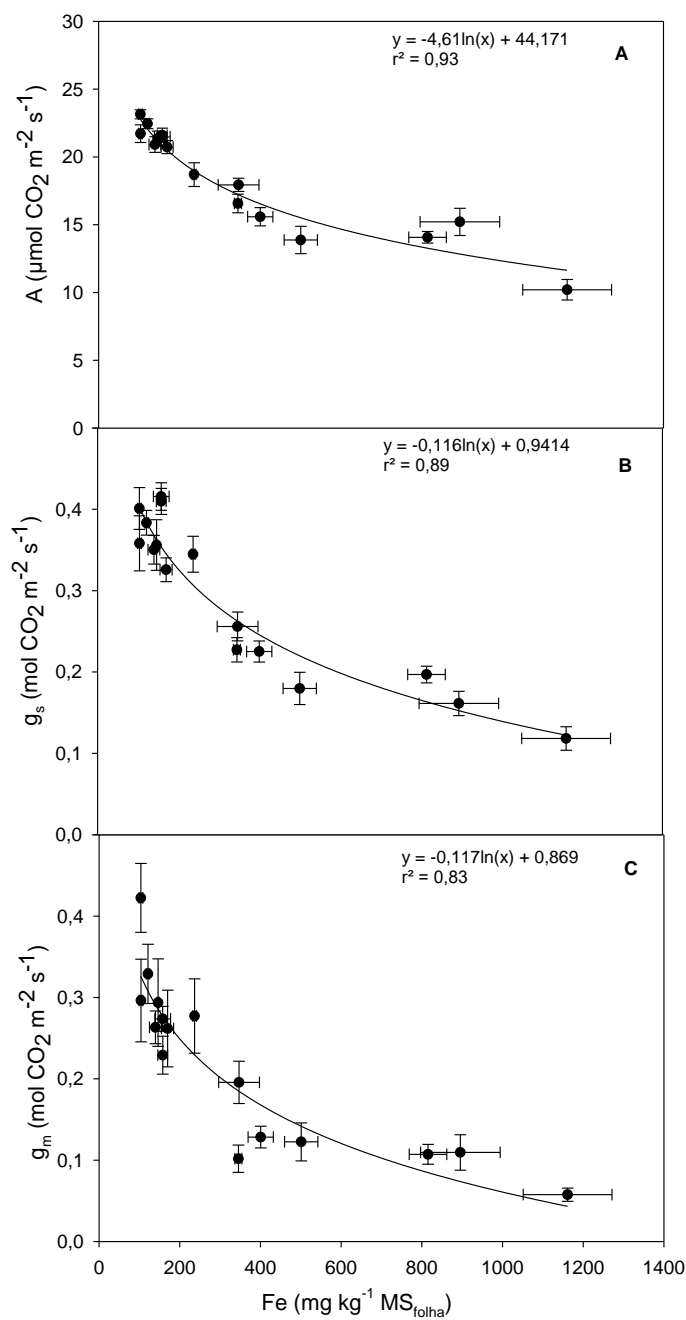
**Yamaji, N., Ma, J.F.,** A transporter at the node responsible for intervascular transfer of silicon in rice. *Plant Cell* 21, 2878–2883, 2009.

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

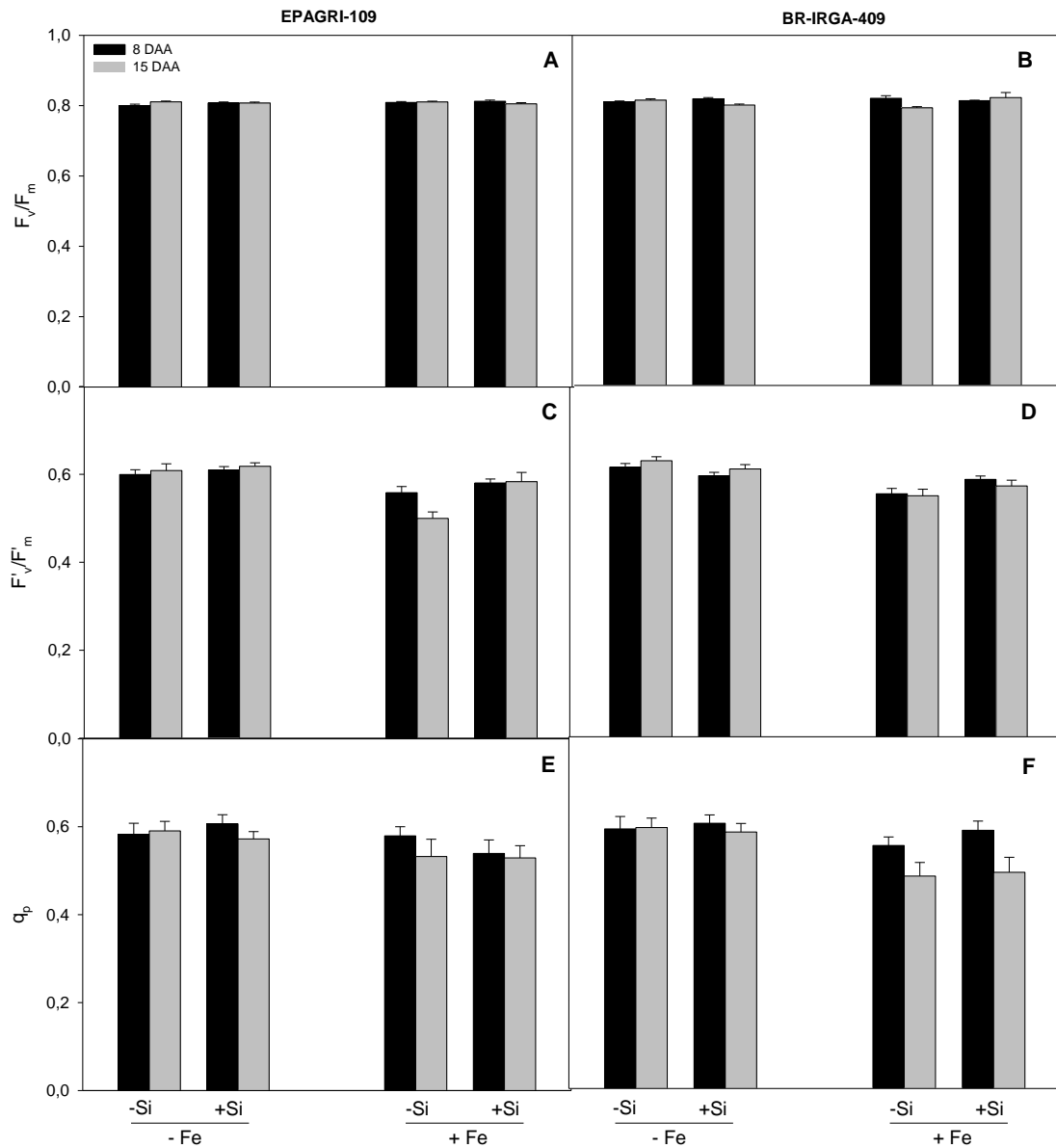
**Von Caemmol L-1 erer, S.; Farquhar, G.D.;** Some relationships between the biochemistry od photosynthesis and the gas exchange of leaves. *Planta*, 153:376-387,1981.

**Wingler, A.; Lea, P.J.; Quick, W.P.; Leegood, R.C.** Photorespiration: Metabolic pathways and their role in stress protection. *Philosophical Transactions of the Royal Society London B: Biological Science* 355:1517-1529, 2000.

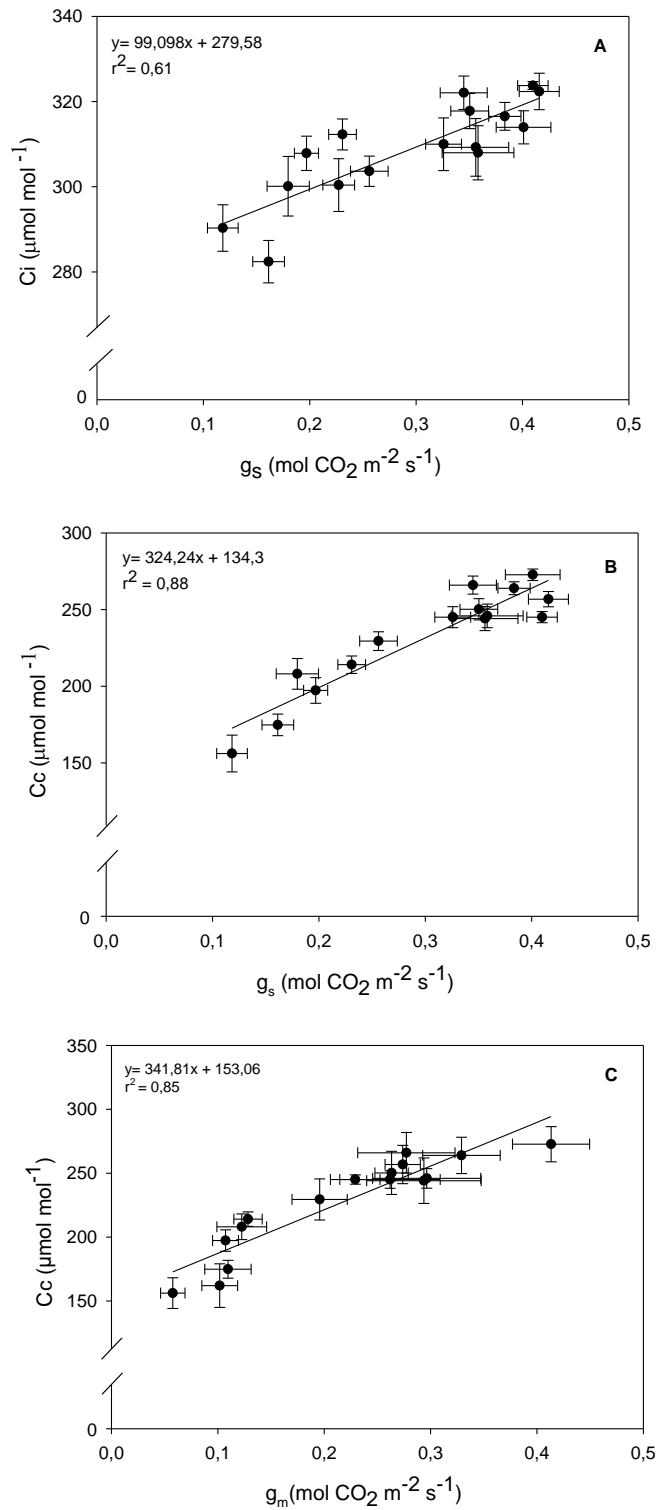
## ANEXO I – Dados suplementares



**Fig. 1** – Relação entre o teor de Fe nas folhas e taxa de assimilação de CO<sub>2</sub> (A) para a condutância estomática ao CO<sub>2</sub> (g<sub>s</sub>) e condutância do mesofilo ao CO<sub>2</sub>: (A) Fe e A, (B) Fe e g<sub>s</sub>; (C) Fe e g<sub>m</sub>.



**Fig 2 .** Os efeitos do silício, Si (0 ou 2 mmol L<sup>-1</sup>: -Si ou + Si, respectivamente) e ferro, Fe (25 μmol L<sup>-1</sup> e 5 mmol L<sup>-1</sup>: -Fe e + Fe, respectivamente), sobre a razão da eficiência quântica máxima da clorofila a,  $F_v/F_m$  (A e B), eficiência da captura da energia de excitação nos centros de reação PSII abertos,  $F_v'/F_m'$  (C e D) e coeficiente de extinção fotoquímica,  $q_p$  (C e D), em duas cultivares de arroz (EPAGRI-109 e BR-IRGA-409, tolerante e sensível ao Fe, respectivamente) cultivadas em solução nutritiva. Medições foram realizadas aos 8 e 15 dias após adição de Fe (DAAT). n = 12 ± SE.



**Fig. 3** – Relação entre a concentração interna de  $\text{CO}_2$  ( $C_i$ ) e concentração de  $\text{CO}_2$  nos sítios de carboxilação do cloroplasto ( $C_c$ ) para a condutância estomática ao  $\text{CO}_2$  ( $g_s$ ) e condutância do mesófilo ao  $\text{CO}_2$ : (A)  $C_i$  e  $g_s$ , (B)  $C_c$  e  $g_s$ ; (C)  $C_c$  e  $g_m$ .

**Tabela 1-** Siglas e nomes das principais enzimas analisadas do metabolismo do carbono em plantas sensíveis ( BR-IRGA-409) e tolerantes ( EPAGRI-109) de arroz submetidas ao excesso de Fe e suplementadas com Si.

<b>Sigla</b>	<b>Nome da enzima</b>
RubisCo	Ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase oxigenase
PGK	Fosfoglicerato-cinase
NADP-GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase dependente de NADP
Aldolase	Aldolase
TPI	Triose-fosfato isomerase
Glicose- 6PDH	Glicose-6-fosfato desidrogenase
Transaldolase	Transaldolase
SuSy	Sacarose sintase
Invertase ácida	Invertase ácida
Invertase alcalina	Invertase alcalina
NAD-GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase dependente de NAD
Enolase	Enolase
Hexocinase	Hexocinase
ATP-PFK	Fosfofructocinase dependente de ATP
PK	Piruvato cinase
NAD-MDH	Malato desidrogenase dependente de NAD

## CAPÍTULO II

SANTOS, Martielly Santana, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2017.  
**O papel do silício na toxidez por Fe em arroz: uma abordagem morfoanatômica.**  
Orientador: Fábio Murilo DaMatta.

### RESUMO

Em arroz de cultivo de várzea, a toxidez por ferro (Fe) acarreta redução no crescimento e danos morfoanatômicos. Por outro lado, a fertilização com silício (Si) confere proteção e ameniza os efeitos de uma gama de estresses bióticos e abióticos. Informações preliminares sugerem que o Si pode reduzir as concentrações de Fe em arroz sob excesso desse elemento, mas os mecanismos envolvidos nessa redução são desconhecidos. Objetivou-se, pois, determinar o efeito da fertilização com Si sobre a toxidez por Fe, avaliando-se aspectos morfológicos, anatômicos e moleculares de raízes e folhas de arroz. Para isso, duas cultivares com respostas contrastantes para excesso de Fe foram cultivadas em solução nutritiva não-aerada suplementadas com Si (0 e 2 mmol L<sup>-1</sup>) e Fe (25 μmol L<sup>-1</sup> e 5 mmol L<sup>-1</sup>). Em excesso de Fe, a fertilização com Si reduziu o teor de Fe em raízes e folhas de ambas as cultivares, o que se refletiu em menores fatores de translocação e de bioconcentração, particularmente na cultivar sensível. Tais respostas foram associadas ao decréscimo na expressão dos genes que codificam para os transportadores de Fe (IRT1 e IRT2), bem como à maior retenção do Fe nas paredes celulares lignificadas do córtex e endoderme na raiz, e em células parenquimáticas do xilema em folhas. Além disso, a redução da placa de Fe nas cultivares +Si+Fe foi associada, aparentemente, ao espessamento da parede celular da camada esclerenquimática da raiz. Os impactos negativos do Fe sobre a anatomia foram evidenciados pela diferenciação precoce dos tecidos no que se refere à formação de aerênquima, emissão de raízes laterais próximas ao ápice radicular, desorganização e colapso celular. Observou-se uma certa reversão desses efeitos nas plantas fertilizadas com Si. Em conjunto, os resultados aqui obtidos demonstram que a mitigação da toxidez por Fe pelo Si, em cultivares de arroz, é promovida pela redução na absorção e translocação de Fe via retenção em barreiras apoplásticas do esclerênquima e endoderme do sistema radicular.

## 1. INTRODUÇÃO

A toxicidade de ferro (Fe) é o distúrbio nutricional mais evidente em arroz de várzea, devido à maior biodisponibilidade do Fe na forma reduzida ( $\text{Fe}^{2+}$ ) em solos alagados. Os sintomas dessa toxidez são evidenciados por meio de alterações nas respostas fisiológicas e morfoanatômicas, que vão desde decréscimos na taxa fotossintética (Pereira et al, 2013; Müller et al, 2015) à necrose dos tecidos, devido ao colapso celular e, conseqüentemente, redução no crescimento (Audebert e Fofana 2009; Siqueira-Silva et al, 2012; Santana et al, 2014). Porém, o grau dos danos promovidos pelo Fe em arroz dependerá da concentração do metal nos tecidos e da tolerância das cultivares ao excesso de Fe, por mecanismos que envolvem a redução na absorção e/ou translocação, aumento na capacidade antioxidante (Stein et al, 2009; Stein et al, 2014) e compartimentalização de Fe (Arosio et al, 2009; Ravet et al, 2009; Silveira et al, 2009).

As raízes estão em contato direto com a solução de Fe e os danos nesse órgão são expressivos. A cor vermelho-alaranjada é a característica marcante do Fe adsorvido à superfície radicular, caracterizando a chamada placa de Fe. Em arroz, a formação dessa placa está relacionada à perda radial de oxigênio (PRO) e à subsequente oxidação do  $\text{Fe}^{2+}$  em  $\text{Fe}^{3+}$ , que, é então, precipitado na forma de hidróxido de Fe (Fleck et al, 2011). Tem-se sugerido que esse seria um mecanismo de tolerância ao excesso de Fe, por atuar como barreira física, excluindo o Fe do corpo da planta (Green e Etherington, 1977; Stein et al, 2009). Contudo, pesquisas demonstraram que, para espécies de restinga (Siqueira-Silva et al, 2012) e arroz (Pereira et al, 2014), a presença de placa de ferro não impede a absorção, translocação e acúmulo de Fe na parte aérea e, portanto, pode ser considerado um mecanismo de tolerância ao excesso desse metal. Em adição, devido às propriedades físico-químicas da placa, ou seja, acúmulo de hidróxidos de ferro na superfície das raízes, acredita-se que ela favoreça a adsorção e imobilização de nutrientes essenciais, como nitrogênio (N), cálcio (Ca), magnésio (Mg), potássio (K) e manganês (Mn), causando múltiplos distúrbios nutricionais na planta (Pereira et al, 2014; Tripathi et al, 2014; Müller et al, 2015).

A redução na translocação e/ou aumento na compartimentalização do Fe, em vacúolo ou em proteínas denominadas ferritinas, são mecanismos essenciais para a tolerância, pois garante a homeostase celular na parte aérea. As ferritinas são responsáveis por armazenar até 4500 átomos de Fe na sua cavidade proteica, evitando assim a reação do Fe com o oxigênio e a formação de ROS (Briat et al, 2007; Ravet et

al, 2009). Ademais, a tolerância ao excesso de Fe em cultivares de arroz parece estar associada a uma maior atividade das enzimas do estresse oxidativo, que incluem dismutases do superóxido (SOD), redutase da glutatona (GR) e peroxidase do ascorbato (APX) (Stein et al, 2009; Stein et al, 2014). Para o sistema radicular, a tolerância diferencial entre cultivares ao excesso de Fe pode ser relacionada com capacidade de manutenção da homeostase nutricional, poder de oxidação da raiz, seletividade da exoderme e endoderme, deposição da placa de Fe, competição dos nutrientes pelos mesmos transportadores e síntese de quelantes, como fitosideróforos (Pereira et al, 2014; Müller et al, 2015).

O Si é considerado o segundo elemento mais abundante da crosta terrestre (Exley, 1998) e, apesar de não ser considerado um nutriente essencial pelas definições de Arno e Stout (1939), é considerado benéfico devido aos efeitos promissores na mitigação de uma gama de estresses bióticos (Rodrigues et al, 2004; Perez et al, 2014) e abióticos (Sanglard et al, 2014; Abbas et al, 2015), e aumentos de produtividade, conforme observado na cultura do arroz mesmo em condições não-estressantes (Detmann et al, 2012; Lavinsky et al, 2016). Nessa espécie, a absorção do Si é feita apenas na forma de ácido silícico ( $\text{Si}(\text{OH})_4$ ), e a elevada concentração na planta está associada à presença de transportadores específicos de influxo (Lsi1- Low silicon rice 1) e efluxo (Lsi2 - Low silicon rice 2) de Si, identificados nas regiões distais e proximais das células de endoderme e exoderme de raízes laterais, respectivamente (Ma et al, 2006; Ma et al, 2007). Em adição, há também um transportador de Si (Lsi6- Low silicon rice 6), na parte aérea, responsável pelo redirecionamento do Si nas folhas, bainhas e colmos (Yamaji et al, 2008; Yamaji e Ma, 2009; Yamaji et al, 2015).

Na planta, o Si é assimilado aos tecidos vegetais por meio da biossilicificação, que é um processo de ligações químicas primárias entre cadeias poliméricas orgânicas (e.g., aminoácidos) e inorgânicas (e.g., Si) (Hiratsuka et al, 1994; Inanaga et al, 1995; Guerriero et al, 2016). De acordo com Kauss et al (2003), os aminoácidos arginina e lisina (carregados positivamente) e o aumento na expressão do gene PRP1, que codifica uma proteína de parede celular rica em prolina, foram relacionados ao reforço da parede celular induzidos pela polimerização de Si. Os benefícios gerados pela elevada absorção e incorporação do Si em folhas, raízes e colmos em diferentes cultivares de arroz foram evidenciados pela resistência a ataque de patógenos (Rodrigues et al, 2004; Perez et al, 2014) e redução na absorção e, conseqüentemente, bioconcentração dos metais na parte aérea. Tais respostas foram relacionadas com modificações na composição e

propriedades mecânicas da parede celular promovidas pelo Si (Vaculík et al, 2012; Rizwan et al, 2016).

No que se refere à interação Fe/Si, os poucos resultados na literatura são contraditórios, pois, inicialmente, foi proposto por Okuda e Takahashi (1961) que a adição de Si aumentaria o poder de oxidação do  $Fe^{2+}$  e  $Mn^{2+}$  com consequente precipitação na superfície radicular, favorecendo o aumento da placa de ferro. Resultados semelhantes foram obtidos por Lavinsky (2013), que sugeriu que o Si, em condições não estressantes, favoreceu a formação da placa de Fe via deposição de um precipitado contendo Si-O-Fe nas proximidades da coifa. Em contraste, Chalmardi et al (2014) e Dufey et al (2014) verificaram que o fornecimento de Si reduziu a precipitação de  $Fe^{2+}$  na superfície da raiz de arroz, sob excesso de Fe. Além dessa controvérsia, não se tem uma ideia clara da interação Fe/Si sobre a placa de ferro e/ou sobre aspectos morfoanatômicos.

O efeito do Si na mitigação da toxidez por Fe vem sendo associado com a redução no teor desse metal nos tecidos foliares, redução do Fe adsorvido à superfície radicular e potencialização do sistema antioxidante em folhas (Chalmardi et al, 2014; Dufey et al, 2014). Por outro lado, há evidências de que o Si, em plantas de arroz em condições não estressantes, promova mudanças morfoanatômicas no sistema radicular, tais como aumento no diâmetro radicular, redução na área da coifa, aumento na suberização da exoderme e lignificação do esclerênquima (Lavinsky, 2013). Entretanto, não se sabe ao certo se tais alterações morfoanatômicas poderiam impactar a tolerância à toxidez por Fe em plantas fertilizadas com Si. Diante disso, o presente estudo teve por objetivos responder aos seguintes questionamentos: i) A tolerância à toxidez por Fe, promovida pelo Si, estaria relacionada a alterações anatômicas da raiz? ii) A fertilização com silício reduziria a adsorção de Fe na superfície radicular? iii) O Si poderia promover a expressão diferencial de genes envolvidos no transporte de Fe, e este fator reduziria a absorção de Fe? iv) O Si, por potencializar o sistema antioxidante em folhas e raízes, minimizaria os danos celulares promovidos pelo excesso de Fe? Para responder a essas perguntas, duas cultivares de arroz, contrastantes quanto a tolerância ao excesso de Fe, foram cultivadas e os efeitos da suplementação do Si foram avaliados.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Condições de cultivo

O experimento foi conduzido em casa de vegetação no Campus da Universidade Federal de Viçosa (649m, 20°45'20''S e 42°52'40''N), MG, Brasil. Foram utilizadas duas cultivares de arroz (*Oryza sativa* L.: BR-IRGA-409, caracterizada como sensível ao estresse por Fe, e EPAGRI-109, como tolerante (Stein et al, 2009; Stein et al, 2014). As sementes foram lavadas em solução de hipoclorito de sódio por 1 min, seguidas de lavagem em água desionizada por 3 min. Foram germinadas em papel-filtro por 4 dias no escuro, sendo posteriormente transferidas para a luz artificial ( $180 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  fótons) sob um ciclo de 12/12 h diurno/noite, com umidade relativa de 60/75% e temperatura de 30°C, por um período de 11 dias.

As plantas foram cultivadas em hidroponia, sem aeração, em vasos de 5 L, contendo solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950) com modificações, constituída de  $1,0 \text{ mmol L}^{-1} \text{ KNO}_3$ ;  $0,25 \text{ mmol L}^{-1} \text{ NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ ;  $0,1 \text{ mmol L}^{-1} \text{ NH}_4\text{Cl}$ ;  $0,5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ;  $1,0 \text{ mmol L}^{-1} \text{ Ca} (\text{NO}_3)_2$ ;  $0,30 \mu\text{mol L}^{-1} \text{ CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ;  $0,33 \mu\text{mol L}^{-1} \text{ ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ;  $11,5 \mu\text{mol L}^{-1} \text{ H}_3\text{BO}_3$ ;  $3,5 \mu\text{mol L}^{-1} \text{ MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ;  $0,1 \mu\text{mol L}^{-1} (\text{NH}_4)_6 \text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ;  $25 \mu\text{mol L}^{-1} \text{ FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  e  $25 \mu\text{mol L}^{-1}$  EDTA disódico. As plantas foram fertilizadas com Si (ao longo de todo o experimento), nas concentrações de sem (-Si) ou  $2 \text{ mmol L}^{-1}$  (+Si), fornecido na forma de ácido monossilícico ( $\text{H}_4\text{SiO}_4$ ), obtido pela passagem do silicato de potássio através de uma coluna trocadora de cátions (AMBERLITE IR-120B;  $\text{H}^+$  form; Sigma- Aldrich, São Paulo, Brasil). O pH da solução de cultivo foi ajustado diariamente para 5,0, utilizando-se NaOH ( $1 \text{ mol L}^{-1}$ ) ou HCl ( $1 \text{ mol L}^{-1}$ ). O experimento foi conduzido em casa de vegetação climatizada, como temperatura ajustada para  $30 (\pm 2) ^\circ\text{C}$ , sob iluminação natural ( $\sim 1500 \mu\text{mol fótons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ).

Plantas com 45 dias (estádio vegetativo) foram submetidas ao estresse por excesso de Fe, aplicado na forma de Fe-EDTA ( $\text{FeSO}_4$ ), na concentração de  $25 \mu\text{mol L}^{-1}$  (plantas-controle) ou  $5 \text{ mmol L}^{-1}$ , correspondente à condição ambiental de excesso de Fe, típica da região Sul do Brasil, a segunda maior produtora de arroz do país (Stein et al, 2014). Todas as avaliações e amostragens foram realizadas aos 8 e 15 dias após aplicação do tratamento (DAAT) de Fe.

## 2.2 Quantificação do Si e Fe em folhas e raízes

Folhas e raízes foram coletadas e secas em estufa com circulação forçada de ar a 60 °C, até massa constante. Em seguida, o material vegetal foi triturado e a concentração de Si nesses órgãos foi determinada colorimetricamente (Dallagnol et al, 2011). O Fe foi extraído por digestão nitroperclórica e sua concentração determinada por espectrometria de absorção atômica (Malavolta et al, 1989).

Após a quantificação do Fe acumulado na parte aérea e no sistema radicular, foram estimados o fator de translocação (FT) e o fator de bioconcentração (FBC), de acordo com Bao et al (2009). O FT é definido como a razão da concentração de Fe na parte aérea da planta e a concentração de Fe nas raízes ( $\text{mg kg}^{-1}$ ). O FBC, por sua vez, refere-se à razão da concentração de Fe na planta e a concentração de Fe na solução nutritiva:  $\text{FBC} = (C_f - C_i) / C_s$ , em que  $C_f$  = concentração de Fe no órgão ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) exposto ao excesso de Fe,  $C_i$  = concentração de Fe no órgão ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) das plantas controle,  $C_s$  = concentração de Fe na solução nutritiva ( $\text{mg L}^{-1}$ ).

## 2.3 Extração e determinação da placa de ferro da superfície radicular

Para a quantificação do Fe adsorvido às raízes, 7 g do perfil da raiz, de cada repetição, foram coletados e adicionados à solução de extração, composta por ditionito, citrato e bicarbonato de sódio (DCB) (Taylor e Crowder 1983). Cada amostra de raiz foi adicionada a uma solução contendo 40 mL de citrato de sódio  $0,3 \text{ mol L}^{-1}$  ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$ ) e 5 mL de bicarbonato de sódio  $1 \text{ mol L}^{-1}$  ( $\text{NaHCO}_3$ ). À solução foram adicionados 3 g de ditionito de sódio ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ ) e a mistura foi agitada por 3 h, em agitador orbital (modelo MA 140, Marconi, Piracicaba, SP). Após esse período, as raízes foram lavadas três vezes com 15 mL de água destilada e o volume final ajustado para 100 mL. O Fe presente na solução de extração foi quantificado por espectrometria de absorção atômica (modelo Spectra 220 FS, Varian, Austrália).

## 2.4 Morfologia da raiz

A caracterização morfológica do sistema radicular foi feita por análise de imagens obtidas usando-se o programa WinRhizo (WinRhizo Pro Régent Instruments, Québec, Canada). Essas imagens foram capturadas por um scanner (Image scanner III com imagem DPI 23,6 pixels.mm) que contém uma cuba de acrílico de 20 cm de largura por 30 cm de comprimento contendo água, onde as raízes foram dispostas para a mensuração do valor médio da área total de superfície radicular ( $\text{cm}^2$ ), diâmetro

médio (mm) e comprimento médio da raiz, considerando os diâmetros (D) de:  $0 < D \leq 1$  -  $1 < D \leq 3$  -  $3 < D \leq 4,5$  (mm) do sistema radicular (Meng-Ben, 2009; McCormac et al, 2015).

## **2.5 Análise anatômica e histoquímica de folhas e raízes**

Para os estudos anatômicos, foram coletadas amostras de folha completamente expandida, entre 5 e 10 cm a partir do ápice. Para as raízes, as coletas foram feitas em três regiões distintas: 0-1 cm, 2-4 cm e 5-10 cm a partir do ápice radicular. Os cortes foram fixados por 48 h em glutaraldeído 2,5% em solução tampão cacodilato de sódio  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 6,4, a  $4^\circ\text{C}$ . Lâminas permanentes foram confeccionadas a partir de material desidratado em série etanólica, incluído em metacrilato, seccionado em micrótomo rotativo, sendo parte das lâminas submetidas ao processo de coloração com azul de toluidina a 1%, pH 4,0 e montado em Permout (O'Brien et al, 1990) e outra parte destinada a detecção histoquímica do Fe.

Para o teste histoquímico, lâminas foram incubadas por 50 min em solução de Perls (igual volume de HCl 4% (v/v) e 4% (m/v) de K-ferrrocianeto), sendo posteriormente lavadas com água destilada. Em seguida, as lâminas foram incubadas por 1 h em metanol contendo azida de sódio ( $\text{NaN}_3$ )  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$  e 0,3% (v/v) de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , seguida de lavagem em tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,4. Por fim, a reação de intensificação foi realizada incubando-se as lâminas por 30 min em solução contendo 0,025% (m/v) de DAB (tetracloridrato, Sigma, StLouis, Mo, EUA), 0,005% (v/v) de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e 0,005% (m/v) de  $\text{CoCl}_2$ . O teste forma coloração negra dada pela reação do ferrrocianeto com o  $\text{Fe}^{2+}$ . O branco do teste foi feito seguindo a metodologia supracitada, mas sem o uso de K-ferrrocianeto (Fig 1 Suplementar) (Roschztardz et al 2013; Brumbarova e Ivanov, 2014). As análises e a documentação dos resultados foram realizadas em microscópio fotônico (modelo AX 70 TRF, Olympus Optical, Tokyo, Japão) equipado com sistema U-photo e câmera AxioCam (Carl Zeiss, Jena, Alemanha).

## **2.6 Microscopia eletrônica de varredura e espectrometria de energia dispersiva de raios-X (EDS)**

Amostras da raiz foram coletadas em três regiões distintas: 0-1 cm, 2-4 cm e 5-10 cm a partir do ápice radicular, sendo fixadas em glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 6,9, por 4 h, lavadas em tampão cacodilato de

sódio (três vezes por 10 min), desidratadas em série etanólica e levadas à secagem até o ponto crítico (CPD 030, Bal-Tec, Balzers, Liechtenstein). Em seguida, parte das amostras foi coberta com carbono (Quorum Q150 T) para análise do Fe por dispersão de raios-X e outra coberta com ouro coloidal por metalização no aparelho “sputter coater” acoplado a um “freezing drying unit” (modelo FDU010 Bal-Tec, Balzers, Liechtenstein) para obtenção das imagens. Eletromicrografias foram obtidas em microscópio eletrônico de varredura LEO (modelo 1450 VP Carl Zeiss, Cambridge, Inglaterra), operado a 10 kV, equipado com detector de energia dispersiva de raios-X (EDS), utilizando o ródio e germânio como padrões internos do Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV.

## **2.6 Enzimas do sistema antioxidante e danos oxidativos em folhas e raízes**

As atividades das enzimas dismutases do superóxido (SOD), peroxidases do ascorbato (APX), redutase da glutatona (GR) e catalase (CAT) foram determinadas em extratos brutos, obtidos a partir de folhas e raízes maceradas em nitrogênio líquido (N<sub>2</sub>), seguida de adição de 2 mL de tampão fosfato de sódio 1 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,2, com posterior centrifugação a 12,000 g por 15 min, a 4°C (Peixoto et al, 1999).

A atividade total da SOD foi determinada pela medição da capacidade de inibir a redução fotoquímica do cloreto de p-nitro-azul-tetrazólio, a 560 nm (Beauchamp e Fridovich, 1971; Giannopolits e Ries, 1977). A atividade total da APX foi determinada acompanhando-se a queda da absorvância a 290 nm, enquanto a atividade de GR foi avaliada pela medição da taxa de oxidação do NADPH, a 340 nm (Nakano e Asada, 1981). Para a CAT, a estimativação foi feita via medição da taxa de decomposição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a 240 nm (Havir e Mchale, 1987). Os danos celulares foram analisados com base no acúmulo de malondialdeído (MDA), estimado pelo conteúdo total de ácido-2-tiobarbitúrico, tal como detalhado em Lima et al (2002).

## **2.7 Extração de mRNA, síntese de cDNA e PCR em tempo real (qPCR)**

O RNA total foi extraído utilizando-se do reagente Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), de acordo com o manual do fabricante. A integridade do RNA foi verificada em géis de agarose a 1% (p/v) e a concentração foi medida antes e após a digestão com DNase I, utilizando-se de um espectrofotômetro. A digestão com DNase I (Amplificação Grade DNase I, Invitrogen) foi realizada, de acordo com as instruções do fabricante. Subsequentemente, a partir do RNA total, foi sintetizado o

cDNA, utilizando uma síntese de primeira linha SuperScript III SuperMix para qRT-PCR (Invitrogen). O programa de PCR foi montado da seguinte forma: 95°C durante 3 min e 40 ciclos de 95°C durante 10 s, 65°C durante 15 s, e 72°C durante 15 s. Para a análise da expressão gênica, foi utilizado o PCR em Tempo Real (Step One Plus™ Sistema de PCR em Tempo Real, Applied Biosystems, CA, EUA) com o SYBR green na detecção de fluorescência (Applied Biosystems1), utilizando-se o sistema Platinum1 SYBR1 Verde qPCR SuperMix-UDG com kit ROX.

A abundância de transcritos foi calculada pelas curvas-padrão de cada gene, normalizado com os genes Ubiquitina e Histona H3, expresso constitutivamente. A expressão dos genes que codificam para os transportadores de Fe (IRT1 e IRT2) e ferritinas (FER1 e FER2) foi avaliada em raízes e folhas. Os dados foram analisados utilizando-se SDS 2.3 Software (Applied Biosystems). A média do CT de referência do controle foi utilizada para a análise da expressão relativa. Para a normalização dos dados de expressão gênica, seus valores foram subtraídos da CT do gene de referência ( $\Delta$ CT). Para calcular o  $\Delta\Delta$ CT,  $\Delta$ CT de interesse foi subtraído do  $\Delta$ CT da condição-controle (tida como referência). Estes resultados foram transformados numa escala  $\log_2$  para a obtenção dos valores apresentados.

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

Gene	Foward	Reverse
<b>Ubiquitina</b>	5'-AGAAGGAGTCCACCCTCCACC-3'	5'-GCATCCAGCACAGTAAAACACG-3'
<b>Histona H3</b>	5'-AGTTTGGTCGCTCTCGATTTTCG-3'	5'-TCAACAAGTTGACCACGTCACG-3'
<b>FER1</b>	5'-GCA AACGCCACACGCGCCTC-3'	5'-CAC TGC CCCGGGTCCGGCA-3'
<b>FER2</b>	5'-GGCTCCACATCAACCAACCAC-3'	5'-AGGGATAGATATAGGCGCGTGGA-3'
<b>IRT1</b>	5'CGTCTTCTTCTTCTCCACCACGAC-3'	5'-GCAGCTGATGATCGAGTCTGACC-3'
<b>IRT2</b>	5'CGTTCACACGCGGGGCAGCAAG-3'	5'GGATGATGATCCGTACGGCAGAAG-3'

## 2.8 Análise estatística

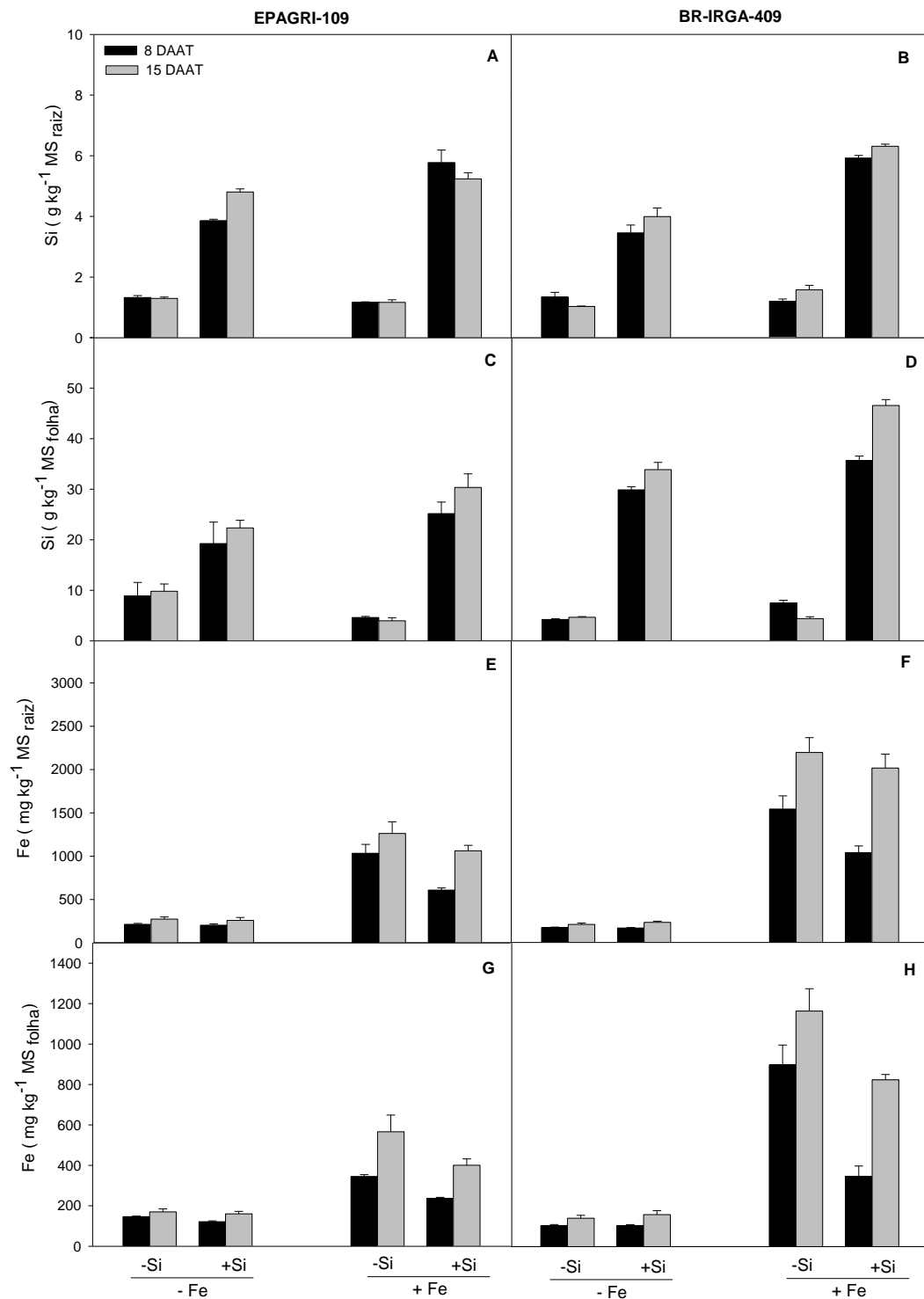
O experimento foi montado em um delineamento inteiramente casualizado com oito tratamentos combinados em um fatorial triplo 2x2x2 (duas cultivares x duas concentrações de Fe x duas concentrações de Si) com seis repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância (three-way ANOVA) com todos os fatores avaliados como sendo fixos, usando-se o procedimento MIXED do SAS (versão 9.1) e um  $\alpha =$

0.05. Quando não ocorreu interação significativa, o MIXED foi usado para interpretar o efeito de dependência entre os fatores.

### **3. RESULTADOS**

#### **3.1 Si reduz o teor de Fe na parte aérea por afetar FT e FBC**

A fertilização silicatada favoreceu o aumento no teor de Si em raízes e folhas das cultivares EPGARI-109 (tolerante o excesso de Fe) e BR-IRGA-409 (sensível ao excesso de Fe), porém, com incrementos mais expressivos nas folhas da cultivar sensível, sob excesso de Fe, quando comparada com a tolerante na mesma condição (Tabela 1 e 2). Maiores teores de Fe foram verificados nas raízes e folhas da cultivar sensível. Contudo, a fertilização com Si nas plantas +Fe reduziu significativamente os teores de Fe em ambos os órgãos, independentemente da cultivar e do tempo (interação Si x Fe significativa). Esse efeito foi mais pronunciado nas plantas da cultivar sensível, com decréscimo médio de 61% e 32% nos teores de Fe aos 8 DAAT (raízes e folhas, respectivamente) e 8 e 29% aos 15 DAAT (raízes e folhas, respectivamente), quando comparadas com suas contrapartes -Si+Fe (interações Fe x Si e Fe x Ct significativas).

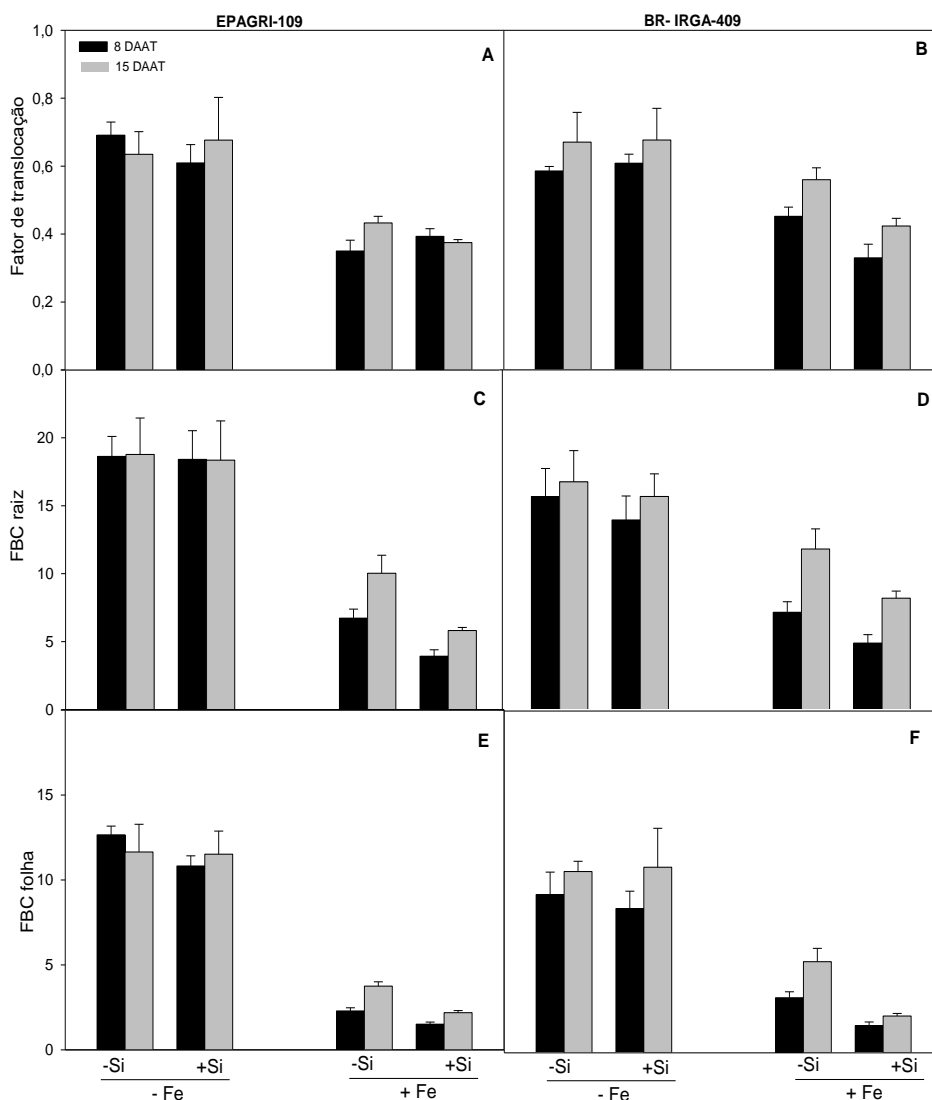


**Fig 1.** Efeitos do silício, Si (0 ou 2 mmol L<sup>-1</sup>: -Si ou + Si, respectivamente) e do ferro, Fe (25 µmol L<sup>-1</sup> e 5 mmol L<sup>-1</sup>: -Fe e +Fe, respectivamente) na concentração de Si (A-B) e de Fe (E-F) nas raízes, e Si (C-D) e Fe (G-H) nas folhas, em duas cultivares de arroz [EPAGRI-109 e IRGA-409, tolerante e sensível a toxidez de Fe, respectivamente], cultivadas em solução nutritiva. As medições foram realizadas aos 8 ou 15 dias após a adição de Fe (DAA). n = 5 ± SE

As reduções no teor de Fe promovidas pelo Si nos tecidos vegetais foram associadas com decréscimos em FT e FBC (Fig 2). O FT foi afetado em ambas as cultivares aos 8 DAAT, independentemente de Si e Fe, porém, nas plantas +Si+Fe da cultivar sensível a redução em FT foi em torno de 25% quando comparada com as plantas -Si+Fe (interação Si x Fe significativa). O excesso de Fe, mas não de Si, acarretou reduções em FT aos 15 DAAT nas duas cultivares. Ademais, o FBC foi maior nas raízes do que nas folhas (Fig 2 C-F). Contudo, a fertilização com Si foi responsável por reduzir o acúmulo de Fe na raiz aos 8 e 15 DAAT em ambas cultivares (interação Si x Fe, Fe x Ct significativa) (Tabela 2, Fig 2 E-F). Padrão similar de resposta foi observado para o FBC dos tecidos foliares das plantas +Si+Fe, porém, com reduções mais acentuadas na cultivar sensível (Fig 2; interações Si x Fe, Fe x Ct significativas).

**Tabela 2.** Resultado da ANOVA (ns = não significativo; \*P< 0.05; \*\*P <0.01; \*\*\*P<0.001) para os efeitos do silício (Si), Ferro (Fe) e cultivar (Ct) e suas interações para os teores de Si e Fe, fator de translocação (FT), fator de bioconcentração (FB), Placa de ferro no ápice e zona de alongamento, e morfologia externa das raízes (área de superfície, diâmetro e classes de raízes). Os resultados são apresentados na forma x/y, i.e. após 8 e 15 dias após a adição de Fe (DAAT). Quando os resultados se apresentam iguais, usa-se a mesma significância para ambos.

Parâmetros	Si	Fe	Si x Fe	Ct	Si x Ct	Fe x Ct	Si x Fe x Ct
Si na raiz	***	***/**	***	ns	ns	ns/***	ns
Si na folha	***	*/**	**/***	***	ns/***	ns/*	ns
Fe na raiz	*/**	***	*/***	***	ns	***	ns
Fe na folha	***	***	***	***	*/ns	***	**/*
FT	**/ns	***	*/ns	*/ns	ns	ns	ns
FBC na raiz	*	***	*/**	*/ns	ns	**/ns	ns
FBC na folha	ns	***	**	**/ns	ns	*	ns
Placa de Fe	***	***	***	**/***	*/ns	**/***	*/ns
Placa de Fe-EDS-ápice radicular	**/ns	***/ns	*/ns	ns	ns	ns	ns
Placa de Fe-EDS zona de alongamento	*/ns	***/ns	*/ns	ns	ns	ns	ns
Área de superfície (cm <sup>2</sup> )	***	***	ns	ns	ns	ns	ns
Diâmetro médio de raízes (mm)	ns	ns	ns	**	ns	ns	ns
1º ordem (diâmetro 0< D.<=1)	***	***	ns	*	ns	ns	ns
2º ordem (diâmetro 1< D.<=3)	***	***	ns	ns	**	ns	*/ns
4º ordem (diâmetro 3< D.<4.5)	ns	***	ns	***	ns	***	*/ns

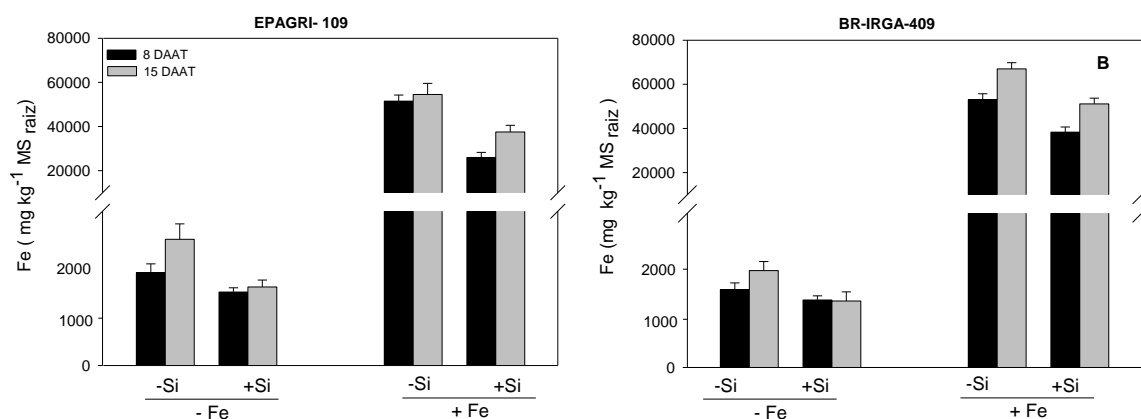


**Fig 2.** Os efeitos de silício, Si (0 ou 2 mmol L<sup>-1</sup>: -Si ou + Si, respectivamente) e ferro Fe (25 µmol L<sup>-1</sup> ou 5 mmol L<sup>-1</sup>: -Fe e + Fe, respectivamente) no fator de translocação (A-B), fator de bioconcentração da raiz (C-D) e fator de bioconcentração das folhas (E-F) em duas cultivares de arroz (EPAGRI-109 e BR-IRGA-409, tolerante e sensível ao Fe, respectivamente), cultivadas em solução nutritiva. As medições foram realizadas aos 8 e 15 dias após a adição de Fe (DAAT). n = 5 ± SE.

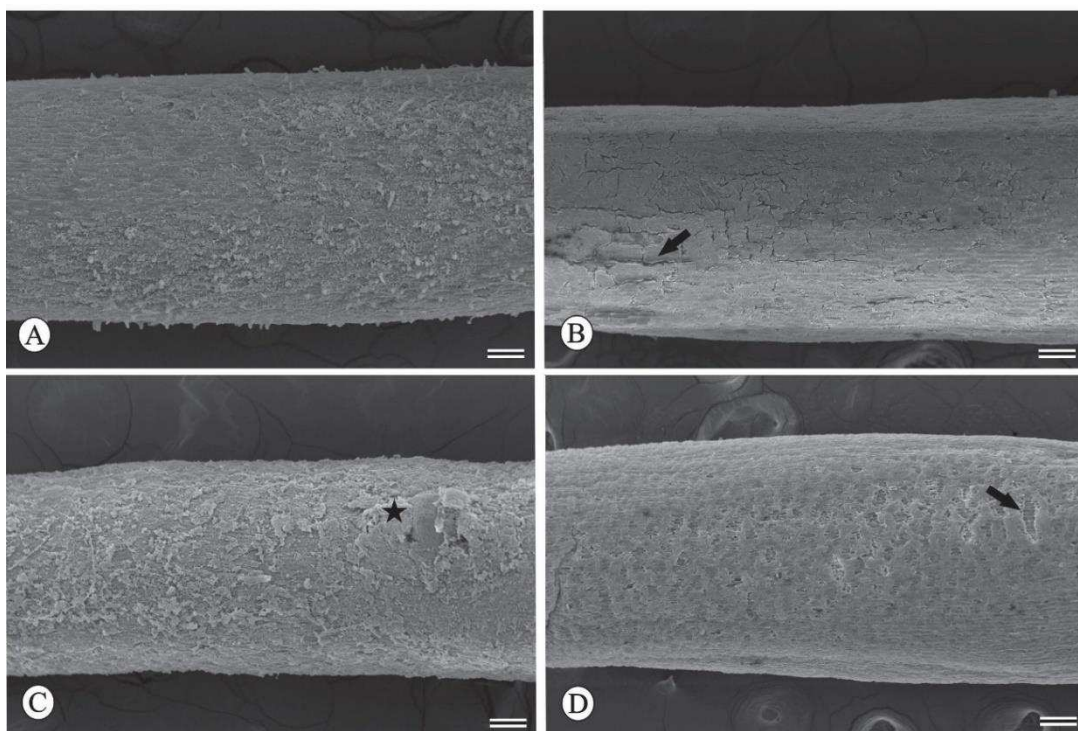
### 3.2 O Si reduz a formação da placa de Fe no sistema radicular

A presença de Fe na solução de cultivo favoreceu a sua adsorção à superfície radicular, dando-lhe uma cor amarelo-alaranjada, denominada placa de Fe. Embora tenha sido observado um padrão estatístico complexo para a placa de Fe (interações significativas entre todos os tratamentos), pôde-se perceber claramente, via quantificação em espectrometria de absorção atômica, reduções da placa decorrentes da adição de Si aos 8 e 15 DAAT, tanto nas plantas -Fe como nas +Fe (Tabela 2, Fig 3), porém, com redução mais marcante na cultivar tolerante que na sensível ao excesso

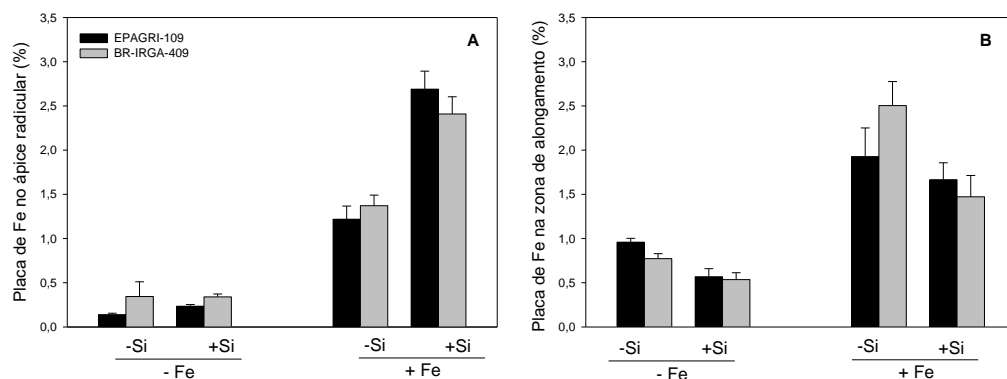
de Fe. Em uma análise pormenorizada, feita para detectar Fe adsorvido à superfície radicular, por meio de EDS acoplado a microscopia eletrônica de varredura, verificou-se diferença entre a deposição de Fe no ápice radicular e zona de alongamento aos 8 DAAT, em que o ápice apresentou maior deposição de Fe em relação ao observado na zona de alongamento (Fig.4 e Fig 5). Este padrão, contudo, não foi mais observado aos 15 DAAT ao analisarem-se as mesmas regiões (Tabela 2; Fig 2- Suplementar)



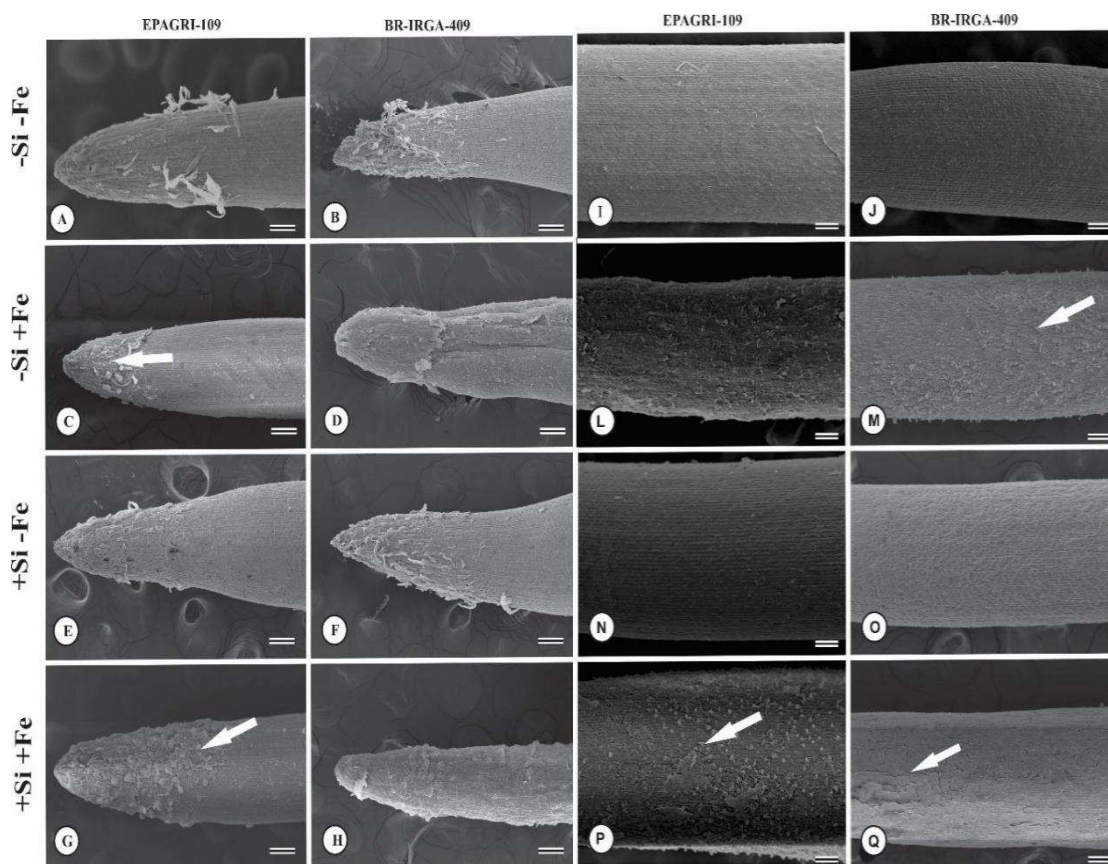
**Fig 3.** Os efeitos do silício, Si (0 ou 2 mmol L<sup>-1</sup>: -Si ou + Si, respectivamente) e ferro, Fe (25 µmol L<sup>-1</sup> ou 5 mmol L<sup>-1</sup>: -Fe e + Fe, respectivamente), sobre a concentração de Fe adsorvido à superfície radicular (placa de Fe) em duas cultivares de arroz (EPAGRI-109 e BR-IRGA-409, tolerante e sensível à toxidez por Fe), cultivadas em solução nutritiva. As medições foram realizadas aos 8 dias após a adição de Fe (DAA). n = 5 ± SE.



**Fig 4-** Adsorção de Fe na zona de alongamento da superfície radicular da cultivar sensível (A-B) e tolerante (C-D) à toxidez por Fe nos tratamentos -Si+Fe (A-C) e +Si+Fe (B-D), em microscopia eletrônica de varredura, evidenciando redução no Fe adsorvido em ambas as cultivares fertilizadas com Si aos 8 DAAT. estrela = emissão de raiz lateral sob placa de Fe, seta= lacunas na superfície radicular sem deposição de Fe. Barra: 100 µm



**Fig 5.** Os efeitos do silício, Si (0 ou 2 mmol L<sup>-1</sup>: -Si ou + Si, respectivamente) e ferro, Fe (25 μmol L<sup>-1</sup> ou 5 mmol L<sup>-1</sup>: -Fe e + Fe, respectivamente), sobre a concentração de Fe adsorvido à superfície radicular (placa de Fe) do ápice radicular e zona de alongamento em duas cultivares de arroz (EPAGRI-109 e BR-IRGA-409, tolerante e sensível ao Fe, respectivamente), cultivadas em solução nutritiva. As medições foram realizadas aos 8 dias após a adição de Fe (DAA). n = 4 ± SE. Os dados são referentes as análises de EDS acoplado a microscopia eletrônica de varredura.



**Fig 6.** Efeitos do silício, Si (0 ou 2 mmol L<sup>-1</sup>: -Si ou + Si, respectivamente) e ferro, Fe (25 μmol L<sup>-1</sup> ou 5 mmol L<sup>-1</sup>: -Fe e + Fe, respectivamente), sobre o Fe adsorvido à superfície do ápice radicular nos tratamentos -Si-Fe (A-B), -Si+Fe (C-D), +Si-Fe (E-F) e +Si+Fe (G-H); e zona de alongamento nos tratamentos -Si-Fe (I-J), -Si+Fe (L-M), +Si-Fe (N-O) e +Si+Fe (P-Q), nas cultivares EPAGRI-109 (tolerante ao Fe) e IRGA-409 (sensível ao Fe), respectivamente, evidenciando maior deposição de Fe no ápice radicular (seta) na condição +Fe da cultivar tolerante (C-G) quando comparada a sensível (D-H), enquanto na zona de alongamento ambas as cultivares +Si+Fe apresentaram menor deposição de Fe (seta). Barra= 100 μm.

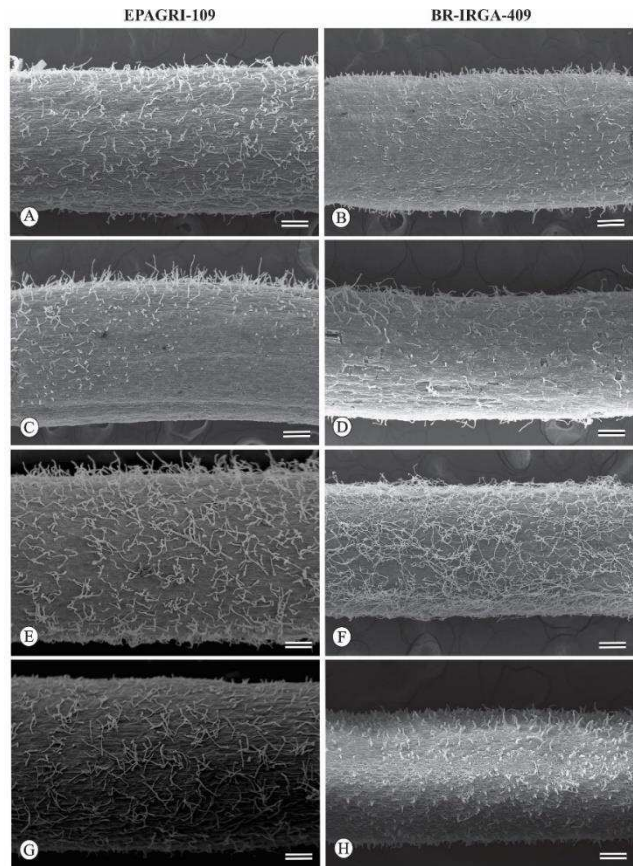
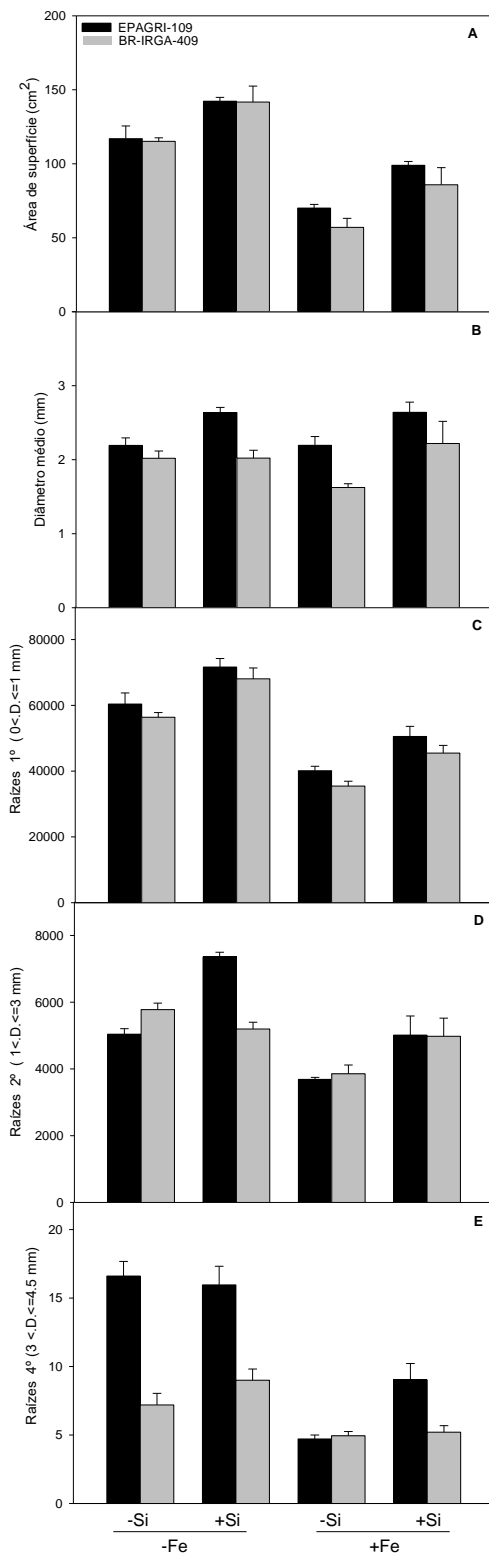
O excesso de Fe promoveu outras modificações nas raízes, como a perda da zona de alongamento e a redução no tamanho das raízes laterais, que passaram a ser emitidas mais próximas à coifa (Fig 7), independentemente da adição de Si. Como consequência, o crescimento radicular e a área superficial de absorção de nutrientes foram comprometidos. De fato, essas alterações foram bem acentuadas, a ponto de não permitir as análises de expressão gênica aos 15 DAAT de exposição ao excesso de Fe, devido à degradação do tecido radicular. Dessa forma, as investigações que se seguem foram focadas nos efeitos da interação Fe/Si apenas aos 8 DAAT.



**Fig 7-** Aspectos morfológicos da raiz, evidenciando os efeitos do silício, Si (0 ou 2 mmol L<sup>-1</sup>: -Si ou + Si, respectivamente) e ferro, Fe (25 μmol L<sup>-1</sup> ou 5 mmol L<sup>-1</sup>: -Fe e + Fe, respectivamente), sobre o Fe adsorvido à superfície radicular nos tratamentos -Si-Fe (A e E), -Si+Fe (B e F), +Si-Fe (C e G) e +Si+Fe (D e H); em duas cultivares de arroz (EPAGRI-109 e IRGA-409, tolerante e sensível ao Fe, respectivamente), cultivadas em solução nutritiva. Seta= zona de alongamento na tolerante (A e C) e sensível (E e G) e perda dessa zona nas plantas +Fe, independentemente do Si. Barras =10 mm.

A área superficial da raiz aumentou significativamente nas plantas +Si, mas reduziu-se nas plantas +Fe, sem, contudo, haver efeitos sinérgicos (interações Si x Fe, Si x Ct, Fe x Ct não significativas). O diâmetro das raízes não foi afetado pelos tratamentos, tendo apenas uma diferença intrínseca entre as cultivares, em que o diâmetro da cultivar tolerante foi maior que quando comparada com a sensível. O diâmetro médio das raízes (1º, 2º e 4º ordem) respondeu diferencialmente aos tratamentos impostos. Em ambas cultivares, a toxidez de Fe, independentemente do Si, acarretou redução na proporção de raízes de 1º ordem (interações Si x Fe, Si x Ct e Fe x Ct não significativas). Contudo, para raízes de 2º ordem, diferença significativa foi evidenciada apenas nas plantas +Si da cultivar tolerante, com aumentos na

condição controle (+Si -Fe) (interação Si x Ct significativa) e sob estresse (+Si+Fe), respectivamente (Fig 8 e 9).

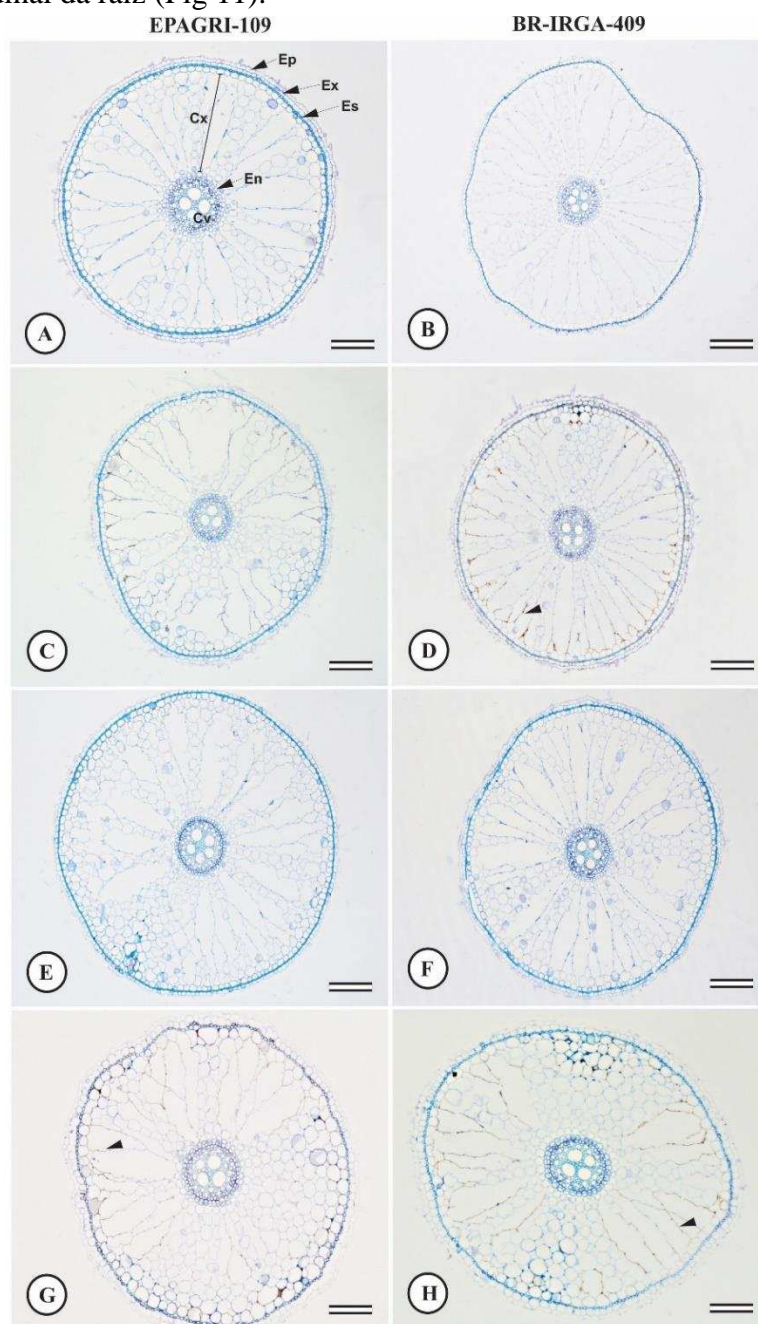


**Fig 9.** Eletromicrografias de varredura evidenciando a distribuição dos pelos radiculares nas raízes sob os tratamentos -Si -Fe (A-B), -Si +Fe (C-D) +Si -Fe (E-F) +Si +Fe (G-H) em duas cultivares de arroz EPAGRI-109 e BR-IRGA-409, tolerante e sensível ao Fe, respectivamente), cultivadas em solução nutritiva (barra = 200  $\mu$ m).

**Fig 8.** Os efeitos de silício, Si (0 ou 2 mmol L<sup>-1</sup>: -Si ou + Si, respectivamente) e ferro Fe (25  $\mu$ mol L<sup>-1</sup> ou 5 mmol L<sup>-1</sup>: -Fe e + Fe, respectivamente) na área de superfície (A), diâmetro médio (B), diâmetro de raízes 1° (C) 2° (D) 4° ordem em duas cultivares de arroz (EPAGRI-109 e BR-IRGA-409, tolerante e sensível à toxicidade de Fe, respectivamente), cultivadas em solução nutritiva. As quantificações foram realizadas aos 8 dias após aplicação dos tratamentos (DAAT) n = 5  $\pm$  SE

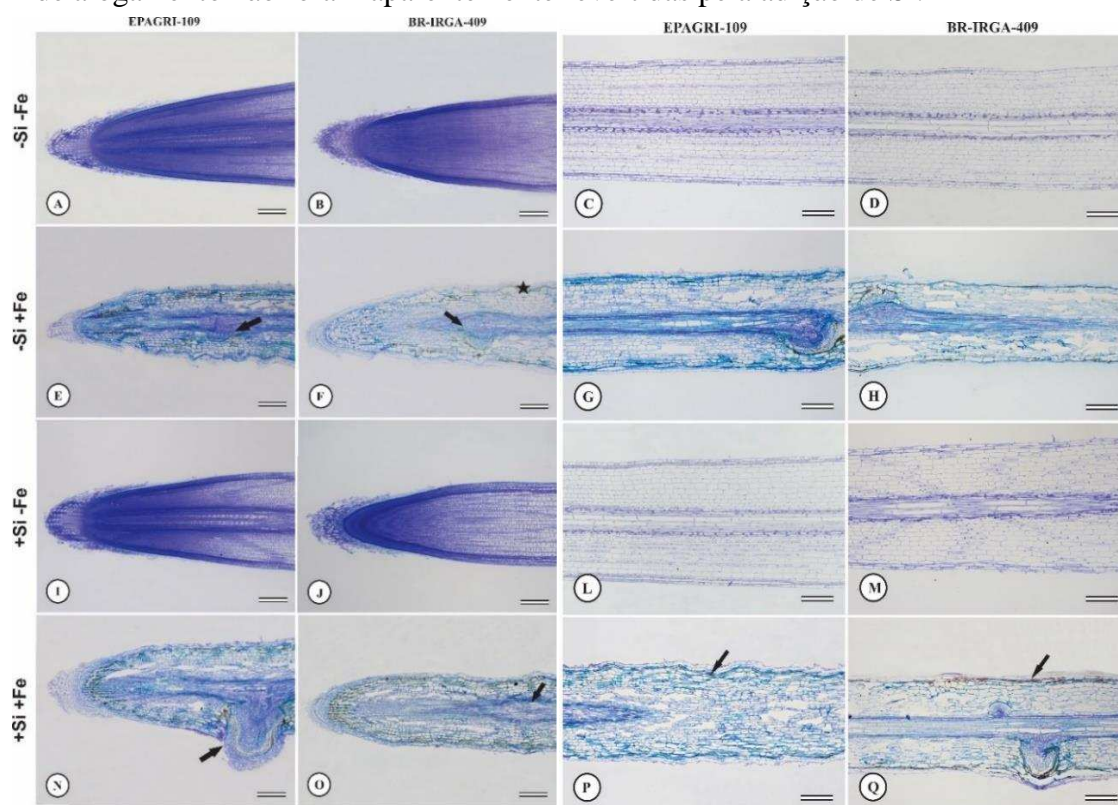
### 3.3 O Fe afeta a anatomia da raiz, mas sem grandes impactos na folha

Em secção transversal da raiz foi possível identificar, sequencialmente da periferia para o centro, a epiderme, exoderme, esclerênquima, córtex com presença de aerênquima, endoderme e o cilindro vascular. A toxidez por Fe afetou sobremaneira a anatomia da raiz, promovendo desde coloração amarelo-alaranjada nas paredes das células do corticais (Fig 10) à desorganização tissular, observada na secção longitudinal da raiz (Fig 11).



**Fig 10** - Secções transversais das raízes sob os tratamentos -Si -Fe (A-B), -Si +Fe (C-D) +Si -Fe (E-F) +Si +Fe (G e H) em duas cultivares de arroz (EPAGRI-109 e IRGA-409, tolerante e sensível à toxidez por Fe), cultivadas em solução nutritiva por 45 dias, Legenda: Ep= epiderme, Ex= exoderme, Es= esclerênquima, Cx= córtex. Barra = 200  $\mu$ m. Seta – coloração amarelo-alaranjada nas paredes do córtex.

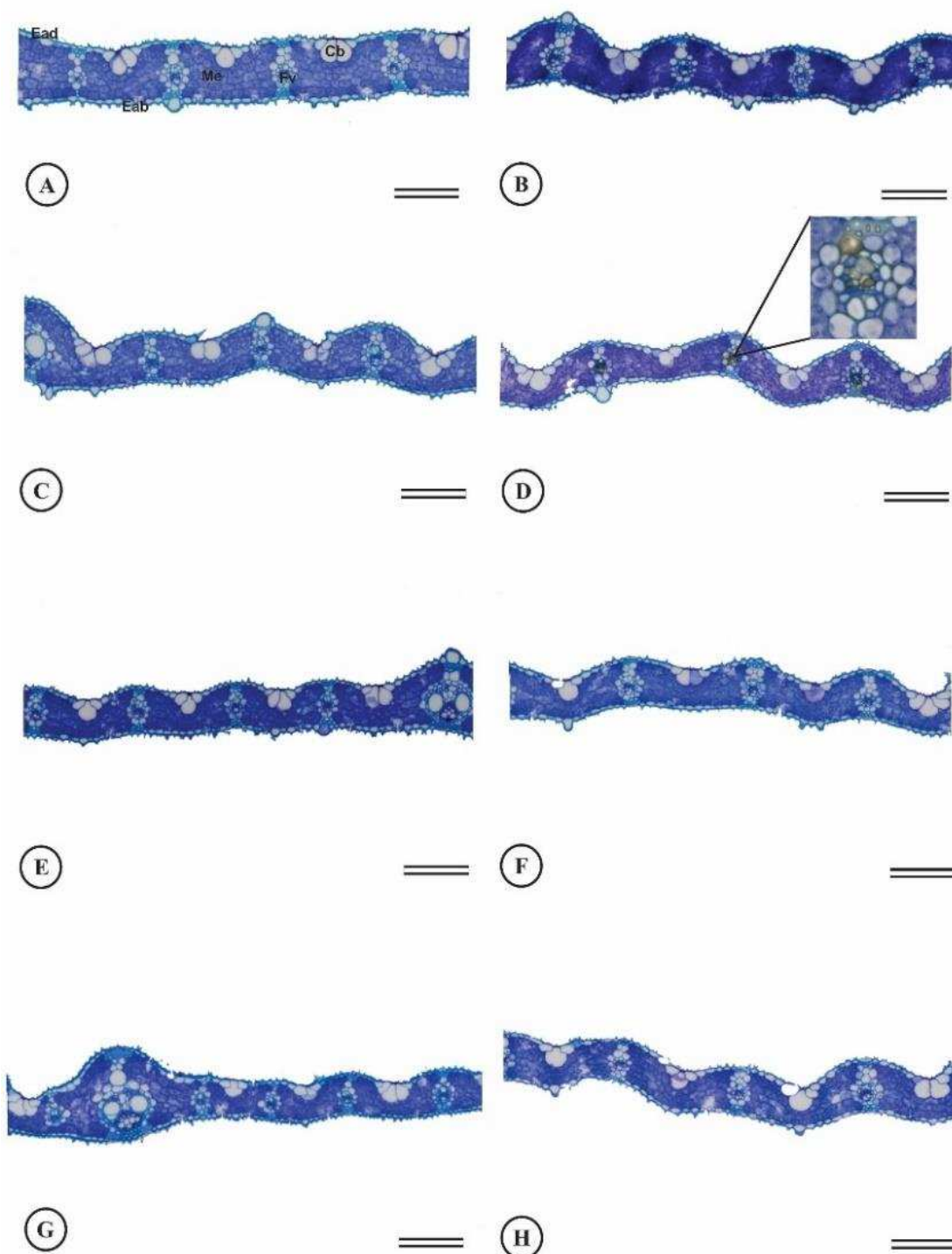
Na seção longitudinal da raiz de ambas cultivares, foi possível verificar anomalias promovidas pelo Fe no que diz respeito à diferenciação precoce dos tecidos, pois a emissão de raízes laterais ocorreu mais próxima do ápice radicular, evidenciando um padrão incomum (Fig 11 N). Foi verificado também desorganização do ápice radicular em tecidos tais como protoderme, meristema fundamental, procâmbio e redução na área da coifa nas cultivares sob excesso de Fe (Fig. 11 E-F), em concordância com as alterações morfológicas que ocorreram na raiz (Fig 7). Além disso, foi observada a formação precoce de aerênquima próximo ao ápice radicular e redução na coifa das plantas +Fe quando comparadas com as plantas -Fe (Fig 11 N-O). Na zona de alongamento (2-4 cm do ápice) o excesso de Fe, independentemente da adição de Si, promoveu desorganização do córtex, reentrâncias na epiderme, formação de aerênquima e emissão precoce de raízes laterais com a coifa associada a material amarelo-alaranjando demonstrado pelo teste histoquímico como Fe (Fig 3 Suplementar). De modo geral, as alterações verificadas no ápice radicular e na zona de alongamento não foram aparentemente revertidas pela adição de Si.



**Fig 11.** Efeitos do silício, Si (0 ou 2 mmol L<sup>-1</sup>: -Si ou + Si, respectivamente) e ferro, Fe (25 µmol L<sup>-1</sup> ou 5 mmol L<sup>-1</sup>: -Fe e + Fe, respectivamente), sobre o ápice radicular nos tratamentos -Si-Fe (A-B), -Si+Fe (C-D), +Si-Fe (E-F) e +Si+Fe (G-H); e zona de alongamento nos tratamentos -Si-Fe (I-J), -Si+Fe (L-M), +Si-Fe (N-O) e +Si+Fe (P-Q), nas cultivares EPAGRI-109 (tolerante ao Fe) e IRGA-409 (sensível ao Fe), respectivamente, evidenciando formação de raiz lateral próximo ao ápice radicular (seta) na condição +Fe na cultivar tolerante (C-G) e

sensível (D-H), enquanto na zona de alongamento ambas as cultivares +Si+Fe apresentaram retenção de Fe na exoderme (seta). Barra= 200  $\mu$ m.

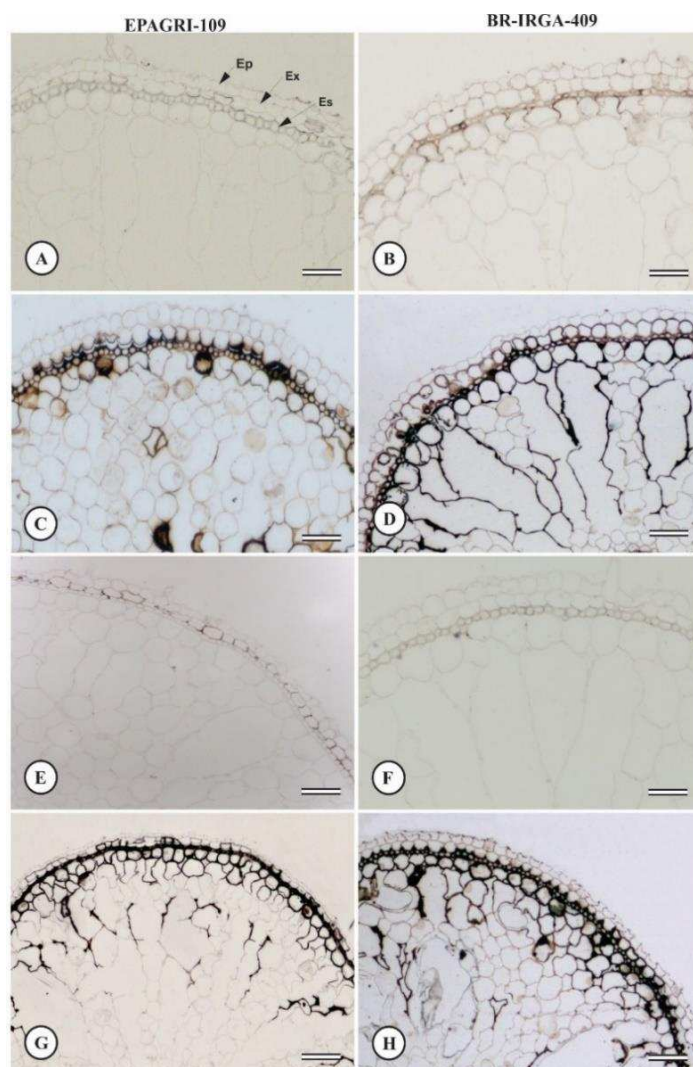
A folha de arroz é anfiestomática e apresenta mesofilo homogêneo, sendo a epiderme papilosa com presença de corpos silicosos na face adaxial e abaxial para ambas as cultivares. Um aspecto interessante é a presença de papilas associadas às regiões polares das células-guarda dos estômatos (Fig. 4 Suplementar). Feixes vasculares colaterais são dispostos paralelamente ao longo da folha, onde o xilema, floema e bainha parenquimática do feixe são destaque entre células buliformes, também chamadas de células motoras. De maneira geral, não foi verificada diferenças anatômicas associadas aos tratamentos aplicados, porém, pôde-se constatar a presença de um composto de cor amarelo-alaranjada nas células da bainha do feixe da cultivar sensível (BR-IRGA-409) sob excesso de Fe (Fig 12-D), indicativo da presença de Fe, fato confirmado pelo teste histoquímico em células parenquimáticas da bainha do feixe vascular (Fig 5 A-B Suplementar).



**Fig 12-** Anatomia foliar, coradas com azul de toluidina, submetidas aos tratamentos -Si-Fe (A-B), -Si+Fe (C-D) +Si-Fe (E-F) +Si+Fe (G-H) em duas cultivares de arroz (EPAGRI-109 e BR-IRGA-409, tolerante e sensível ao Fe, respectivamente), cultivadas em solução nutritiva. Leganda: Ead= epiderme da face adaxial, Eab=epiderme da face abaxial, Me= mesofilo, Fv= feixe vascular, Cb= célula buliforme. Barra=50  $\mu$ m.

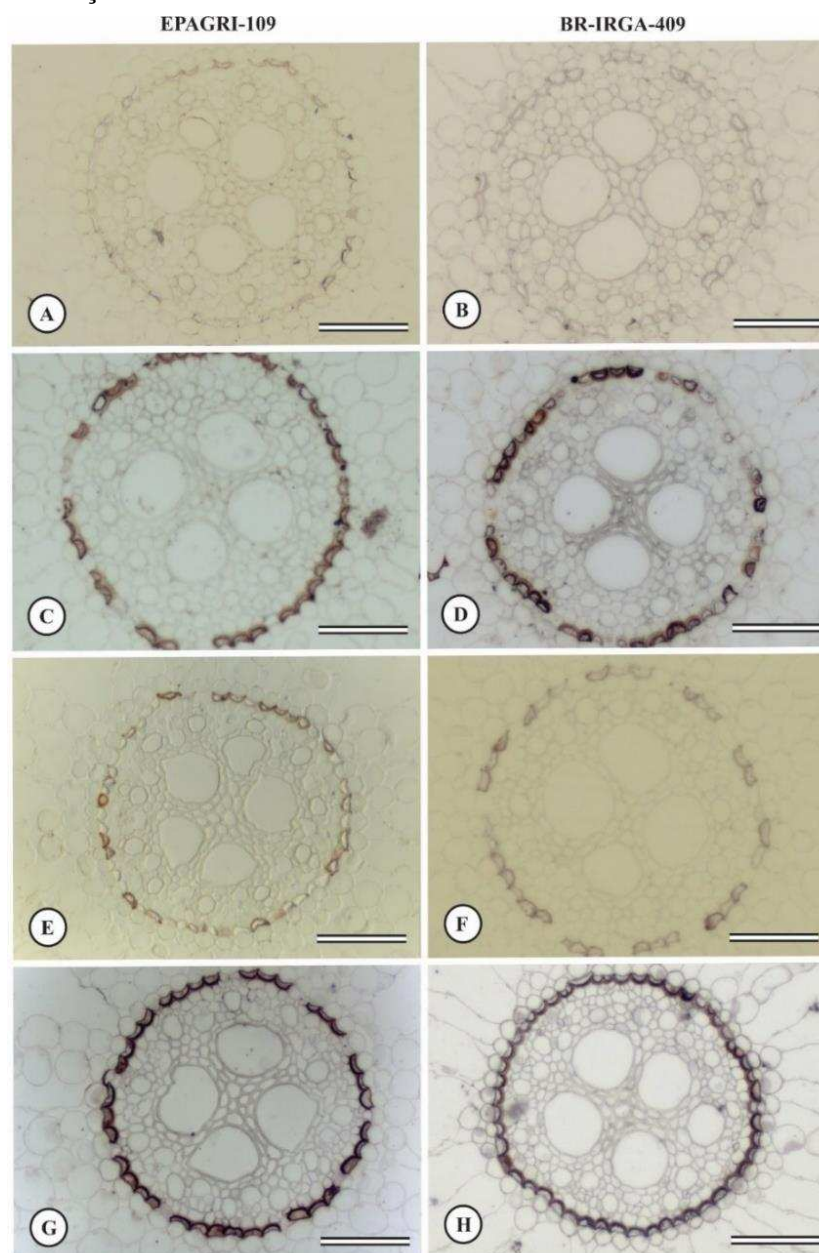
### 3.4 A parede celular constitui-se numa barreira na redução da absorção e translocação de Fe em raízes e folhas

As raízes do arroz, em secção transversal, são compostas por epiderme, exoderme e uma faixa esclerenquimática com parede espessada e lignificada. Na qual por meio do teste histoquímico, foi demonstrada a presença de Fe na parede celular, observando-se maior retenção de Fe nas plantas +Si que nas -Si das duas cultivares (reação positiva mais intensa verificada no teste histoquímico; Fig 13). Note-se ainda que, apesar da detecção de Fe pelo teste histoquímico, não se observou qualquer alteração promovida pela presença de Fe na faixa esclerenquimática em análises anatômicas (Fig 6 Suplementar).



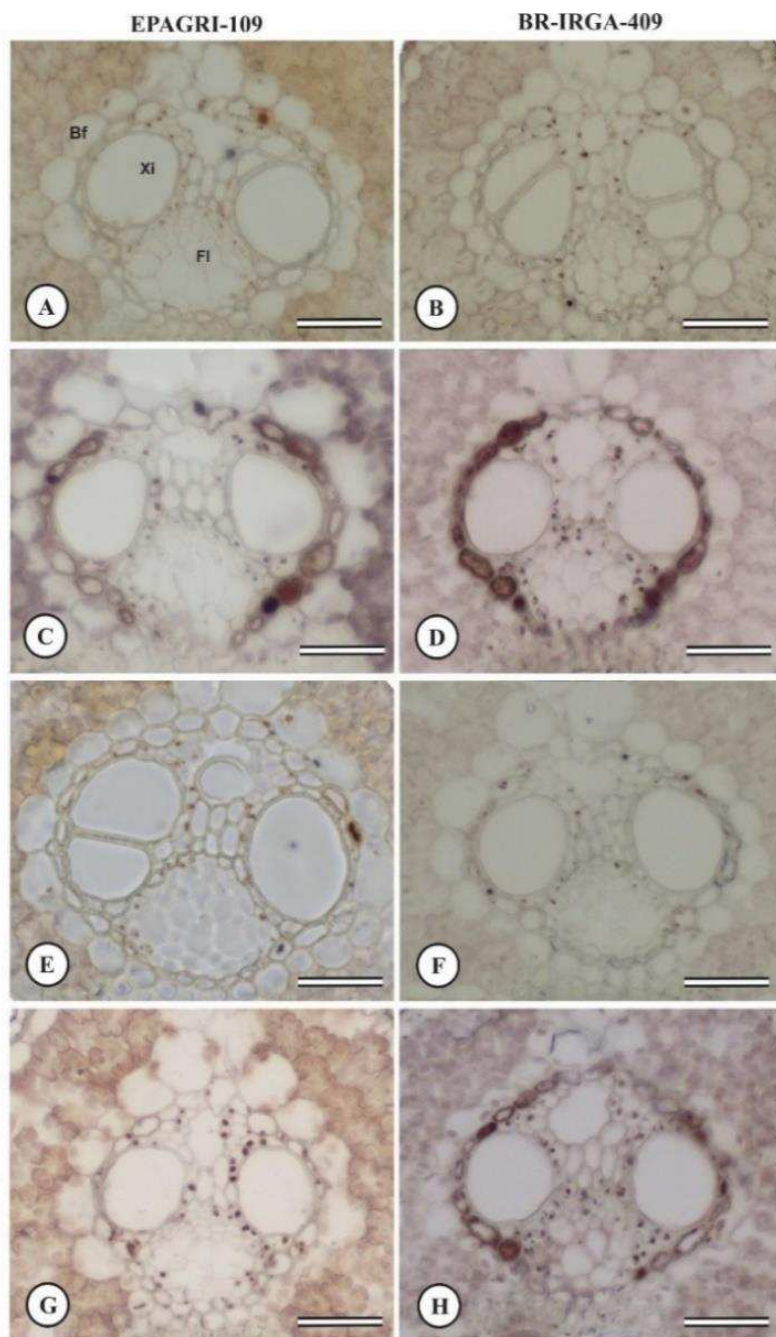
**Fig 13** - Secções transversais das raízes sob os tratamentos -Si -Fe (A-B), -Si +Fe (C-D) +Si -Fe (E-F) +Si +Fe (G-H) nas cultivares tolerante (EPAGRI-109) e sensível (BR-IRGA-409) respectivamente demonstrando a reação positiva para o Fe mas intensa, apenas nas paredes lignificadas da faixa esclerenquimática de ambas as cultivares +Si+Fe. Legenda: Ep= epiderme, Ex= exoderme, Es= esclerênquima. Barra = 100  $\mu$ m.

Na endoderme, é possível observar o espessamento da parede celular em formato de U, em todos os tratamentos (Fig. 7 Suplementar) e, assim como na exoderme, a endoderme também se mostrou como uma importante barreira na retenção do Fe em ambas cultivares, a julgar-se pela reação positiva do teste histoquímico para o Fe. Nas duas cultivares, o excesso de Fe proporcionou reação positiva na parede celular do espessamento em U da endoderme, em que reação mais intensa foi observada nas plantas +Si+Fe quando comparada com a das plantas -Si+Fe (Fig. 14), mas sem diferença entre cultivares.



**Fig 14.** Secções transversais do cilindro vascular de raízes de arroz sob os tratamentos -Si -Fe (A-B), -Si +Fe (C-D) +Si -Fe (E-F) +Si +Fe (G-H) nas cultivares tolerante (EPAGRI-109) e sensível (BR-IRGA-409) respectivamente, demonstrando a reação positiva mais intensas para o Fe nas paredes celulares da endoderme de ambas as cultivares +Si+Fe. Barra = 50  $\mu$ m.

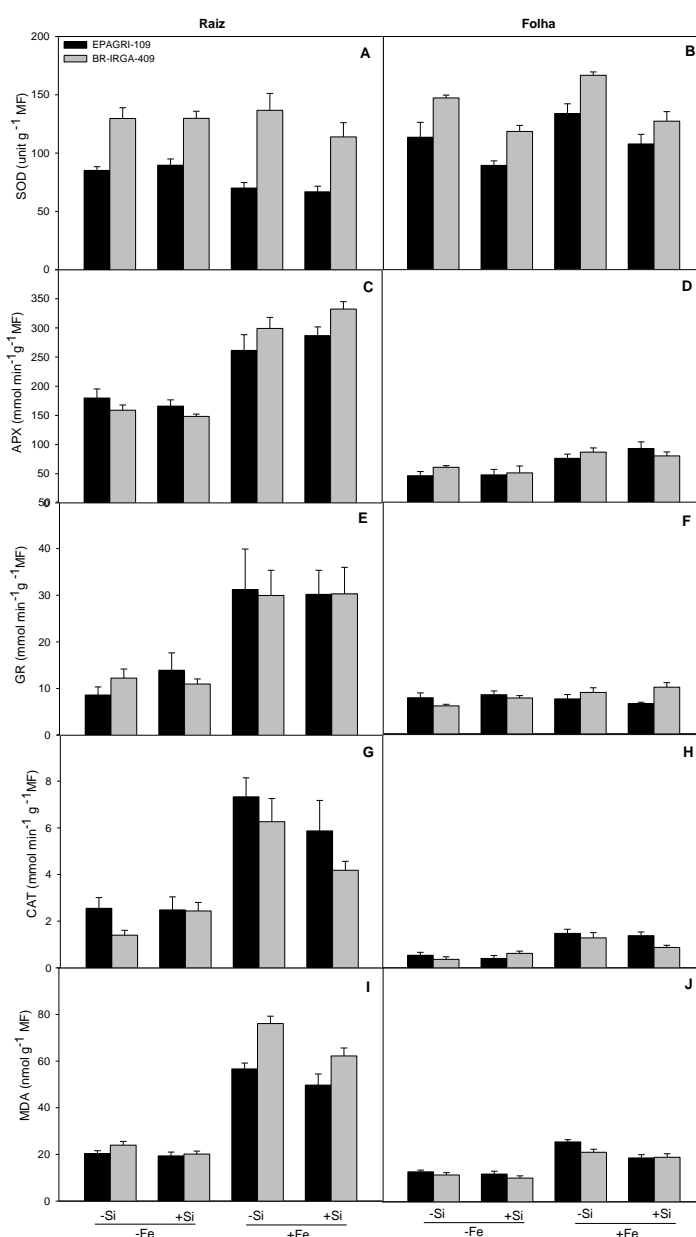
Na folha, não foram evidenciadas alterações estruturais (Suplementar Fig. 8). Porém, pelo teste histoquímico foi possível verificar maior deposição de Fe nas células parenquimáticas do xilema bainha do feixe. Na toxidez por Fe, observou-se maior precipitação de Fe na cultivar sensível que na tolerante, tendo ainda efeito significativo da fertilização com Si na deposição de Fe nessas células parenquimáticas (Fig. 15).



**Fig 15.** Secções transversais da região mediana da folha, evidenciando o feixe vascular nos tratamentos -Si-Fe (A-B), -Si +Fe (C-D) +Si-Fe (E-F) +Si+Fe (G-H) nas cultivares tolerante (EPAGRI-109) e sensível (BR-IRGA-409) respectivamente, demonstrando a reação positiva mais intensa para o Fe nas células parenquimáticas do xilema de ambas as cultivares -Si+Fe. Legenda: Bf= Bainha do feixe, Xi= xilema, Fl= floema. Barra = 50 µm.

### 3.5 A atividade antioxidante é aumentada pelo Fe, mas sem efeito do Si

De modo geral, a atividade das enzimas do estresse oxidativo e os danos à membrana, indicado pela concentração de aldeído malônico (MDA), foram maiores em resposta à toxidez por Fe, com maior magnitude nas raízes que nas folhas, de ambas as cultivares. Contudo, a fertilização com Si não alterou a atividade das enzimas antioxidantes nas raízes e folhas (exceto pela SOD) (interações Si x Fe, Si x Ct não significativas) (Tabela 3, Fig 16). A concentração de MDA foi reduzida nas raízes das plantas +Si+Fe em relação às -Si+Fe, enquanto nas folhas não foi observado qualquer efeito do Si nos níveis de MDA.



**Fig. 16.** Os efeitos de silício, Si (0 ou 2 mmol L<sup>-1</sup>: -Si ou + Si, respectivamente) e ferro Fe (25 μmol L<sup>-1</sup> e 5 mmol L<sup>-1</sup>: -Fe e + Fe, respectivamente) na atividade das enzimas dismutases do superóxido-SOD (A-B), peroxidases do ascorbato- APX (C-D) redutase da glutaciona-GR (E-F) e MDA (I-J) em raízes e folhas de duas cultivares de milho.

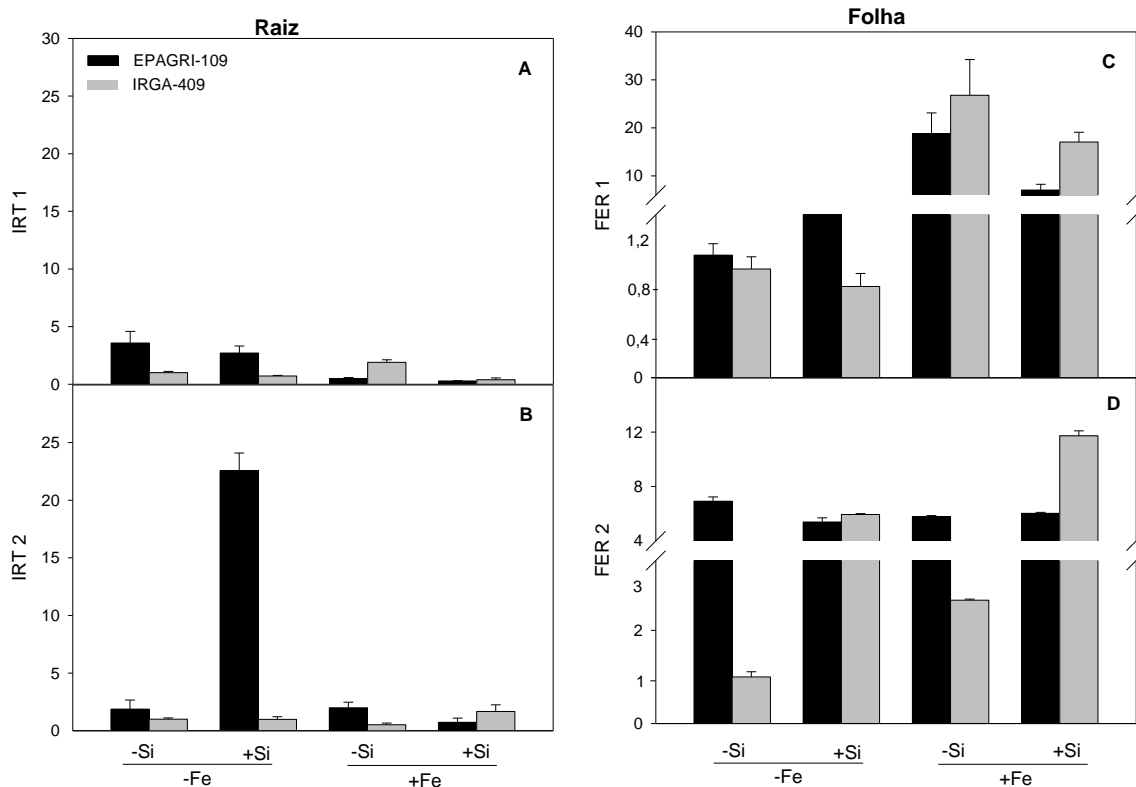
F); catalase-CAT (G-H) e malondialdeído-MDA (I-J) em duas cultivares de arroz [EPAGRI-109 e IRGA-409, tolerante e sensível a toxidez de Fe], cultivadas em solução nutritiva. As medições foram realizadas aos 8 dias após a adição de Fe (DAA). n = 5-6 ± SE

**Tabela 3.** Resultado da ANOVA (ns = não significativo; \*P< 0.05; \*\*P <0.01; \*\*\*P<0.001) para os efeitos do silício (Si), Ferro (Fe) e cultivar (Ct) e suas interações para a atividade das enzimas dismutases do superóxido (SOD), peroxidases do ascorbato (APX), e redutase da glutathiona (GR) catalase (CAT), aldeído malônico (MDA), expressão gênica das ferritinas 1 e 2 (FER1 e FER2) e transportador regulado por Fe 1 e 2 (IRT1 e IRT2). Os resultados são referentes a avaliações feita após 8 dias após a adição de Fe (DAAT).

	Parâmetros	Si	Fe	Si x Fe	Ct	Fe x Ct	Fe x Ct	Si x Fe x Ct
<b>Raiz</b>	SOD	ns	ns	ns	***	ns	ns	ns
	APX	ns	***	ns	ns	ns	**	ns
	GR	ns	***	ns	ns	ns	ns	ns
	CAT	ns	***	*	ns	ns	ns	ns
	MDA	***	***	ns	ns	ns	*	ns
	IRT1	ns	ns	ns	ns	ns	**	ns
	IRT2	ns	ns	ns	**	ns	**	*
	<b>Folha</b>	SOD	***	**	ns	***	ns	ns
APX		ns	***	ns	ns	ns	ns	ns
GR		ns	ns	ns	ns	ns	***	ns
CAT		ns	***	ns	ns	ns	ns	ns
MDA		ns	***	ns	***	ns	ns	ns
FER 1		*	***	ns	ns	ns	ns	ns
FER 2		***	***	***	***	***	***	ns

### 3.6 A expressão de genes envolvidos no transporte e armazenamento de Fe é minimamente afetada pelo Si

No sistema radicular, a expressão relativa dos genes IRT1 e IRT2 (Iron Regulated Transporter), envolvidos no transporte de Fe na raiz, não foi afetada pela toxidez de Fe e/ou fertilização com Si (Tabela 3). Ademais, apesar do cultivar tolerante apresentar aumento significativo na expressão do IRT2 com adição de Si, este efeito foi anulado pelo excesso de Fe independentemente do Si (interações Fe x Ct, Si x Fe x Ct significativas) (Fig 16 A-B). Para as folhas, a toxidez por Fe induziu aumento na expressão de FER1 independentemente da cultivar e da adição de Si (interações Si x Fe, Si x Ct e Fe x Ct não significativas), apesar de haver redução no nível de transcrito nas plantas +Si+Fe de ambas as cultivares. Por outro lado, o Si favoreceu aumento de expressão de FER2 nas folhas da cultivar sensível, sendo o efeito mais marcante do Si verificado nas plantas +Fe, com aumento de 88,3% em relação às -Si+Fe (Tabela 3, Fig 16 D), porém sem efeito do Fe na cultivar tolerante.



**Fig 16.** Efeitos do silício, Si (0 ou 2 mmol L<sup>-1</sup>: -Si ou + Si, respectivamente) e do ferro, Fe (25 μmol L<sup>-1</sup> ou 5 mmol L<sup>-1</sup>: -Fe e +Fe, respectivamente) na expressão dos genes que codificam para os transportadores de Fe: IRT1 (A), IRT2 (B) na raiz e FER1 (E) e FER2 (F) na folha, em duas cultivares de arroz (EPAGRI-109 e IRGA-409, tolerante e sensível a toxidez de Fe), cultivadas em solução nutritiva. As medições foram realizadas aos 8 após a adição de Fe (DAA). n = 4-5 ± SE

#### 4. DISCUSSÃO

As cultivares de arroz tolerante (EPAGRI-109) e sensível (BR-IRGA-409) ao Fe quando submetidas a níveis tóxicos de Fe diferiram quanto ao acúmulo deste elemento, independentemente do tempo de exposição ao excesso de Fe, com maiores teores desse elemento observados em folhas e raízes da cultivar sensível quando comparada com a tolerante. Resultados similares vêm sendo observados para a cultivar BR-IRGA-409 em relação a outras cultivares de arroz tolerantes ao Fe (Müller et al, 2015; Pinto et al, 2016), evidenciando assim a diferença intrínseca das cultivares estudadas para o acúmulo e tolerância ao excesso de Fe. Por outro lado, a fertilização com Si, ao diminuir o teor de Fe em raízes e folhas, contribuiu para a redução na magnitude dos danos na morfologia e anatomia desses órgãos.

A redução no fator de translocação (FT), observada nas plantas +Fe em relação às -Fe, sugere que grande parte do Fe absorvido não foi transferido para a parte aérea, o que é corroborado pelo elevado fator de bioconcentração (FBC) das raízes em relação ao FBC das folhas (Fig 1). Embora a mitigação da toxidez por Fe promovida pelo Si tenha sido associada, pelo menos em parte, à menor translocação e, conseqüentemente, menor bioconcentração de Fe, tanto em folhas como em raízes de ambas cultivares, os teores de Fe acumulado nas raízes e folhas foram superiores aos níveis críticos de toxicidade de Fe ( $\geq 300\text{-}500 \text{ mg kg}^{-1}$  de massa seca) (Dobermann e Fairhurst, 2000), em particular na cultivar sensível quando comparada com a tolerante; isso se traduziu em danos morfoanatômicos, porém, com maior intensidade em ambas as cultivares na condição -Si+Fe em relação às +Si+Fe.

Em arroz, a presença de aerênquima propicia a formação de uma zona oxidativa devido à perda radial de oxigênio (PRO) e a subsequente oxidação do  $\text{Fe}^{2+}$  em  $\text{Fe}^{3+}$ , que é precipitado na forma de hidróxido de Fe, formando a placa de Fe na superfície da raiz (Fleck et al, 2011). No presente estudo, plantas sob excesso de Fe, mas fertilizadas com Si, apresentaram decréscimos na adsorção do Fe à superfície radicular. É provável que essa resposta esteja associada ao aumento na lignificação da exoderme, lignificação do esclerênquima e redução na PRO promovida pelo Si (Fleck et al, 2011; Lavinsky, 2013). Tais premissas são consistentes com a reação mais intensa, ao teste de histolocalização do Fe na parede celular da faixa esclerenquimática das raízes das plantas +Si+Fe (Fig 13), o que sugere o papel dessa faixa como a primeira barreira seletiva no controle da absorção de Fe via apoplastica e, além disso,

a julgar-se pela redução da placa de Fe, essa faixa também atuaria na redução da PRO. Ademais, a retenção de Fe no espessamento em U da parede da endoderme, verificado pela maior intensidade de reação no teste histoquímico para as plantas +Si, provavelmente contribui para redução do Fe translocado para a parte aérea, como observado pelo menor teor de Fe nas folhas, em particular na cultivar sensível (Fig 1). Nesse contexto, inúmeros trabalhos relatam que modificações no metabolismo de compostos fenólicos, lignificação e redução na porosidade das estrias de Caspary promovida pelo Si favoreceria a complexação de metais como o cádmio (Vaculík et al, 2009; Rizwan et al, 2016) e alumínio (Kidd et al, 2001). Assim, este poderia ser também um mecanismo de mitigação do Si sobre a toxidez de Fe, i.e., alterações físico-químicas da parede celular atuaria bloqueando o influxo de Fe via apoplasto. A quantificação de compostos de parede celular, bem como genes envolvidos na sua síntese, podem ser consideradas um ponto-chave para a compreensão dos mecanismos de tolerância a estresse por Fe e outros metais.

A arquitetura do sistema radicular, independentemente da fertilização com Si e da cultivar, foi modificada pela toxidez de Fe. As principais alterações morfológicas foram relacionadas à redução do comprimento da zona de alogamento, emissão de raízes laterais de 1º ordem próxima ao ápice radicular e redução na área de superfície que promoveu, conseqüentemente, decréscimo na biomassa (Capítulo III). Estas modificações na morfologia externa foram correlacionadas com a anatomia, observando-se desorganização tissular, retração da epiderme, formação precoce de aerênquima e morte de ápices radiculares, o que pode ter sido associado, pelos menos em parte, ao estresse oxidativo imposto pelo excesso de Fe. Nesse sentido, o aumento de MDA nas plantas +Fe, indicativo de peroxidação lipídica que poderia alterar a estrutura e permeabilidade da membrana plasmática (Sinha et al, 1997), deve estar relacionado com as alterações anatômicas observadas na raiz. Apesar da fertilização com Si contribuir para a redução no teor de Fe na raiz via barreiras apoplásticas e redução na expressão dos genes IRT1 e IRT2, ainda assim o teor Fe na raiz das plantas +Si+Fe promoveu alterações morfoanatômicas, mas em menor magnitude que nas plantas -Si+Fe.

Nas folhas, não foram observados sintomas anatômicos evidentes da toxidez de Fe, independentemente da fertilização com Si, fato que pode ser associado ao menor teor de Fe nos tecidos, à maior atividade das enzimas do estresse oxidativo e, provavelmente, ao armazenamento de Fe em ferritinas, uma vez que o nível de

expressão dos genes FER1 e FER2 foi aumentado sob toxidez de Fe, tendo ainda um efeito potencializador do Si no nível de transcritos da FER2 na cultivar sensível (Fig 16 F). Ademais, o Fe localizado nas células parenquimáticas da bainha do feixe pode ter reduzido a distribuição do Fe para as demais células do mesofilo, evitando assim possíveis danos celulares. De fato, a homeostase celular para a toxidez por metais tóxicos (e.g., Cd, Al) e essenciais (e.g., Cu, Zn) vem sendo relacionada ao sequestro desses metais em vacúolos (Hall, 2002), parede celular (Kidd et al, 2001; Chika e Huerta, 2008; Rizwan et al, 2016) e, no caso particular do Fe, em proteínas, tal como ferritinas (Connolly e Guerinot, 2002; Ravet et al, 2009). Assim, diferentes mecanismos observados nas folhas de ambas as cultivares de arroz para lidar com o excesso de Fe<sup>2+</sup> presente na célula sugerem, mesmo que de forma indireta, a proteção do aparato fotossintético contra danos oxidativos, fato que poderia explicar, pelo menos em parte, os efeitos negligenciáveis do excesso de Fe sobre a maquinaria fotoquímica e bioquímica associada à fotossíntese (Capítulo I).

Em conclusão, foi demonstrado que a fertilização com Si mitiga os impactos da toxidez por Fe em arroz, via redução do teor do metal em folhas e raízes, fato associado com a menor translocação e bioconcentração do Fe na parte aérea. Essa resposta foi associada, em parte, aos decréscimos na expressão dos genes que codificam para os transportadores de Fe (IRT1 e IRT2) na raiz, bem como a maior retenção do Fe na parede celular da faixa esclerequímica e endodérmica da raiz nas plantas +Si+Fe. Ademais, o menor impacto do Fe sobre as folhas pode ter sido associado com a maior atividade das enzimas do estresse oxidativo, armazenamento de Fe em ferritinas e retenção de Fe nas células parenquimáticas da bainha do feixe, reduzindo assim a distribuição do Fe para as demais células do mesofilo, evitando possíveis danos celulares. De modo geral, a retenção do Fe por barreiras apoplásticas demonstrou ser o mecanismo importante na tolerância à toxidez por Fe, sendo tais barreiras reforçadas pela fertilização com Si. Contudo, são necessários estudos mais detalhados que busquem elucidar a forma de atuação do Si (direta ou indireta) na parede celular, com relação ao teor de compostos fenólicos e lignina, dada a importância da lignificação e suberização da exoderme e endoderme do sistema radicular.

## 5. REFERÊNCIAS

- Arosio, P.; Ingrassia, R.; Cavandini, P.** Ferritins: A Family of molecules for iron storage, antioxidant and more. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1790:589-599, 2009.
- Arnon, D. I.; Stout, P. R.** The essentiality of certain elements in minute quantity for plants with special reference to copper. *Plant physiology*, Washington, 14: 371-375, 1939.
- Audebert, A.; Fofana, M.** Rice yield gap due to iron toxicity in West Africa. *Journal Agronomy & Crop Science*, 195: 66–76, 2009
- Abbas, T.; Balal, R.M.; Shahid, M.A.; Pervez, M.A.; Ayyub, C.M.; Aqueel, M.A.; Javaid, M.M.** Silicon-induced alleviation of NaCl toxicity in okra (*Abelmoschus esculentus*) is associated with enhanced photosynthesis, osmoprotectants and antioxidant metabolism. *Acta Physiologiae Plantarum*. 37: 2-15, 2015.
- Bao, T.; Sun, T.; Zang, P.; Niu, Z.** Iron-deficiency induces cadmium uptake and accumulation in *Solanum nigrum* L. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 82: 338-342, 2008.
- Beauchamp, C.; Fridovich, I.** Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal Biochemistry*, 44:276-287, 1971.
- Brumbarova, T.; Ivanov, R.** Perl's Staining for Histochemical Detection of Iron in Plant Samples. *Bio-protocol*, 20:1-5, 2014.
- Briat, I. F.; Curie, C.; Gaymard, F.** Iron utilization and metabolism in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 10:276-282, 2007.
- Chalmardi, Z.C.; Abdolzadeh, A.; Sadeghipour, H.K.** Silicon nutrition potentiates the antioxidant metabolism of rice plants under iron toxicity. *Acta Physiologiae Plantarum*, 36:493–502, 2014.
- Chika, C. N.; Huerta, A. J.** Effects of silicon nutrition on cadmium uptake, growth and photosynthesis of rice plants exposed to low-level cadmium. *Plant and Soil*, 311:73–86, 2008.
- Connolly, E. I.; Fett, J. P.; Guerinot, M. I.** Metals at the levels of transcript and protein accumulation. *The Plant Cell*, 14: 1347–1357, 2002
- Dallagnol, L.J.; Rodrigues F.A.; DaMatta, F.M.; Mielli, M.V.B.; Pereira, S.C.** Deficiency in silicon uptake affects cytological, physiological, and biochemical events in the rice *Bipolaris oryzae* interaction. *Phytopathology*, 101:92-104, 2011.
- Detmann, K. C.; Araújo, W. L.; Martins, S. C. V.; Sanglard, L. M.V.P.; Reis, J. V.; Detmann, E.; Rodrigues, F. A.; Nunes-Nesi, A.; Fernie, A. R.; DaMatta, F. M.** Silicon nutrition increases grain yield, which, in turn, exerts a feed-forward stimulation of photosynthetic rates via enhanced mesophyll conductance and alters primary metabolism in rice. *New Phytologist* 196: 752-762, 2012.

**Dufey, S. G.; Ingabire, A.; Lutts, S.; Bertin, P.** Silicon Application in Cultivated Rices (*Oryza sativa* L and *Oryza glaberrima* Steud) Alleviates Iron Toxicity Symptoms Through the Reduction in Iron Concentration in the Leaf Tissue. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 200: 132–142, 2014

**Dobermann, A.; Fairhurst, T.** Rice: nutrient disorders and nutrient management. Manila: International Rice Research Institute, 2000. 191 p.

**Exley, C.** Silicon in life: A bioinorganic solution to bioinorganic essentiality. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 69: 139-144, 1998

**Fleck, A.T.; Nye, T.; Repenning, C.; Stahl, F.; Zahn, M.; Schenk, M.K.** Silicon enhances suberization and lignification in roots of rice (*Oryza sativa*). *Journal Experimental Botany* 62: 2001–2011, 2011.

**Fleck, A.T.; Schulze, S.; Hinrichs, M.; Specht, A.; Waßmann, F.; Schreiber, L.** Silicon promotes exodermal Casparian band formation in Si- accumulating and Si-excluding species by forming phenol complexes. *PLoS ONE* 10:1-9, 2015

**Giannopolitis, C. N.; Ries, S. K.** Superoxide dismutases: I. Occurrence in Higher Plants. *Plant Physiology*, 59:309-314, 1977.

**Guerrero, G.; Hausman, J.F.; Legay, S.** Silicon and the Plant Extracellular Matrix. *Frontiers in Plant Science*. 7:463, 2016.

**Green, M. S.; Etherington J. R.** Oxidation of Ferrous Iron by Rice (*Oryza sativa* L.) Roots: a Mechanism for Waterlogging Tolerance? *Journal of Experimental Botany*, 28: 678-690, 1977

**Hall, J.L.** Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of experimental Botany*, 53: 1-11, 2002.

**Havir, E. A.; McHale, N. A.** Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco-leaves. *Plant Physiology*, 84:450-455, 1987.

**Hiratsuka V, M. Lux; A.; M. Luxová.; Tanimoto E.; Lichtscheidl I.** Silicon mitigates cadmium inhibitory effects in young maize plants. *Environmental and Experimental Botany*, 67:52–58, 2009.

**Inanaga, S.; Okasaka, A.; Tanaka, S.** Does silicon exist in association with organic compounds in rice plant? *Journal Soil Science Plant Nutrition*. 41:111–117, 1995.

**Kauss, H.; Seehaus, K.; Franke, R.; Gilbert, S.; Dietrich, R.A.; Kröger, N.** Silica deposition by a strongly cationic proline-rich protein from systemically resistant cucumber plants. *The Plant Journal*, 33: 87–95, 2003.

**Kidd PS, Llugany M, Poschenrieder C, Gunse B, Barcelo J.** The role of root exudates in aluminium resistance and silicon-induced amelioration of aluminium toxicity in three varieties of maize (*Zea mays* L.). *Journal of Experimental Botany* 359, 1339–1352. 2001.

**Lavinsky, A. O.** Efeito do silício na anatomia radicular e na produção de grãos de arroz. (Tese Doutorado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 93f, 2013.

**Lavinsky, A.O.; Detmann, K.C.; Reis, J.V.; Ávila, R.T.; Sanglard, M. L.; Pereira, L.F.; Sanglard, L.M.V.P.; Rodrigues, F. A.; Araújo, W. L.; DaMatta, F.M.** Silicon improves rice grain yield and photosynthesis specifically when supplied during the reproductive growth stage. *Journal of Plant Physiology* 206:125–132, 2016.

**Lima, A.L.S.; DaMatta F.M.; Pinheiro, H.A.; Totola, M.R.; Loureiro, M.E.** Photochemical responses and oxidative stress in two clones of *Coffea canephora* under water deficit conditions. *Environmental and Experimental Botany*, 47:239-247, 2002.

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

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

**Ma, J.F.; Yamaji, N.; Mitani, N.; Tamai, K., Tamai, K.; Katsuhara, M.; Yano, M.** An efflux transporter of silicon in rice. *Nature*, 448: 209-213, 2007.

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

**Malavolta, E.; Vitti, G. C.; Oliveira, S. A.** Evaluation of the nutritional state of plants: principles and applications. Potafos, Piracicaba pp. 201 pp, 1989.

**Meng-Ben, W.; Qiang, Z.** Issues in using the WinRHIZO system to determine physical characteristics of plant fine roots. *Acta Ecologica Sinica* 29: 136–138, 2009.

**Müller, C.; Kuki, K, N.; Pinheiro, D.T.; Souza, L.R.S.; Silva, A.I.S.; Loureiro, M.E.; Oliva, M.A.; Almeida, A.M.** Differential physiological responses in rice upon exposure to excess distinct iron forms. *Plant Soil*, 391: 123–138, 2015.

**McCormack, M.L.; Dickie, I.A.; Eissenstat, D.M.; Fahey, T, J.; Fernandez, C. W.; Guo, D.; Helmisaari, H.S.; Hobbie, Pregitzer, K.S.; Pritchard, S.G.; Rewald, B.; Zadworny, M.** Redefining fine roots improves understanding of below-ground contributions to terrestrial biosphere processes. *New Phytologist*, 207: 505–518, 2015

**Nakano, Y.; Asada, K.** Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiology*, 22:1068-1072, 1981.

**O'Brien TP.; Feder N.; McCully ME.** Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma* 59: 368-73, 1965.

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

- Peixoto, P.H.P.; Cambraia, J.; Santana, R.; Mosquim, P.R.; Moreira, M.A.** Aluminium effects on lipid peroxidation and on the activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 11:137-143, 1999.
- Pereira, E.G.; Oliva, M. A.; Rosado-Souza, L.; Mendes, G. C.; Colares, D, S.; Stopato, C. H.; Almeida, A. M.** Iron excess affects rice photosynthesis through stomatal and non-stomatal limitations. *Plant Science*, 81-89, 2013
- Pereira, E.G.; Oliva, M.A.; Siqueira-Silva, A.I.; Rosado-Souza, L.; Pinheiro, D.T.; Almeida, A.M.** Tropical Rice Cultivars from Lowland and Upland Cropping Systems Differ in Iron Plaque Formation. *Journal of Plant Nutrition*. 37:1373–1394, 2014
- Perez, C. E. A.; Rodrigues, F. Á.; Moreira, W. R.; DaMatta, F. M.** Leaf Gas Exchange and Chlorophyll a Fluorescence in Wheat Plants Supplied with Silicon and Infected with *Pyricularia oryzae*. *Phytopathology*, 104:143-149, 2014
- Pinto, S.S.; Souza, A.E.; Oliva, M.A.; Pereira, E.G.** Oxidative damage and photosynthetic impairment in tropical rice cultivars upon. *Scientia Agricola*. 73: 217-226, 2016.
- Ravet, K.; Touraine, B.; Boucherez, J.; Briat, J.; Gaymard, F.; Cellier, F.** Ferritins control interaction between iron homeostasis and oxidative stress in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 57: 400–412, 2009.
- Rizwan, M.; Meunier, J.D.; Davidian, J.C.; Pokrovsky, O.S.; Bovet, N.; Keller, C.** Silicon alleviates Cd stress of wheat seedlings (*Triticum turgidum* L. cv. Claudio) grown in hydroponics. *Environmental Science and Pollution Research International*. 33:1414–1427, 2016.
- Rodrigues, F.Á.; McNally, D.J.; Datnoff, L.E.; Jones, J.B., Labbé, C.; Benhamou, N.; Menzies, J.; Bélanger, R. R.** Silicon Enhances the Accumulation of Diterpenoid Phytoalexins in Rice: A Potential Mechanism for Blast Resistance. *Biochemistry and Cell Biology*, 94:177-183, 2004.
- Roschttardt, H.; Conéjéro, G.; Divol, F.; Alcon, C.; Luc-Verdeil, J.; Currie, C.; Mari, S.** New insights into Fe localization in plant tissues. *Frontiers in Plant Science*, 4: 350-361, 2013
- Sanglard, L. M.V.P.; Detmann, K. C.; Martins, S. C. V.; Teixeira, R. A.; Pereira, L. F.; Sanglard, M.L.; Fernie, A. R.; Araújo, Sanglard, L. M.V.P.; Martins, S. C. V.; Detmann, K. C., Silva, P.E.M.; Lavinsky, A.O.; Silva, M.M.; Detmann, E., Araújo, W. L.; DaMatta, F. M.** Silicon nutrition alleviates the negative impacts of arsenic on the photosynthetic apparatus of rice leaves: an analysis of the key limitations of photosynthesis. *Physiologia Plantarum*, 152: 355-366, 2014.
- Sanglard, L. M.V.P.; Detmann, K. C.; Martins, S. C. V.; Teixeira, R. A.; Pereira, L. F.; Sanglard, M.L.; Fernie, A. R.; Araújo, W. L.; DaMatta, F. M.** The role of

silicone in metabolic acclimation of rice plants challenged with arsenic. *Environmental and Experimental Botany*. 123: 22-36, 2016.

**Santana, B.V.N.; Araújo, T.O.; Andrade, G.C.; Freitas-Silva, L.F.; Kuki, K.N.; Pereira, E.G.; Azevedo, A.A.; Silva, L.C.** Leaf morphoanatomy of species tolerant to excess iron and evaluation of their phytoextraction potential. *Environmental Science and Pollution Research International*. 21:2550–2562, 2014.

**Silveira, V.C.; Fadanelli, C.; Sperotto, R. A.; Stein, R.J.; Basso, L.A.; Santos, D.S.S.; Junior, I. S.V.; Dias, J.F.; Fett, J.P.** Role of ferritin in the rice tolerance to iron overload. *Scientia Agricola* 66: 549-555, 2009.

**Sinha, S.; Gupta, M.; Chandra, P.;** Oxidative stress induced by iron in *Hydrilla verticillate* (L.f.) Royle: response of antioxidants. *Ecotoxicology and Environmental*. 38: 286-291, 1997

**Siqueira-Silva, A.I.; Silva, L.C.; Azevedo, A.A.; Oliva, M.A.** Iron plaque formation and morphoanatomy of roots from species of resting subjected to excess iron. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 78:265–275, 2012

**Stein, R.J.; Duarte, G.L.; Spohr, M.G.; Lopes, S.I.G.; Fett, J.P.** Distinct physiological responses of two rice cultivars subjected to iron toxicity under field conditions. *Annals of Applied Biology*, 154: 269-277, 2009

**Stein, R.J.; Lopes, S.I.G.; Fett, J.P.** Iron toxicity in field-cultivated rice: contrasting tolerance mechanisms in distinct cultivars. *Theoretical Experimental and Plant Physiology*.26:135-146, 2014

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

**Tripathi, R.D.; Tripathi, P.; Dwivedi, S.; Kumar, A.; Mishra, A.; Chauhan, P.S.; Norton, G.J.; Nautiyal, C.S.** Roles for root iron plaque in sequestration and uptake of heavy metals and metalloids in aquatic and wetland plants. *Metallomics*, 6: 1789-1800, 2014

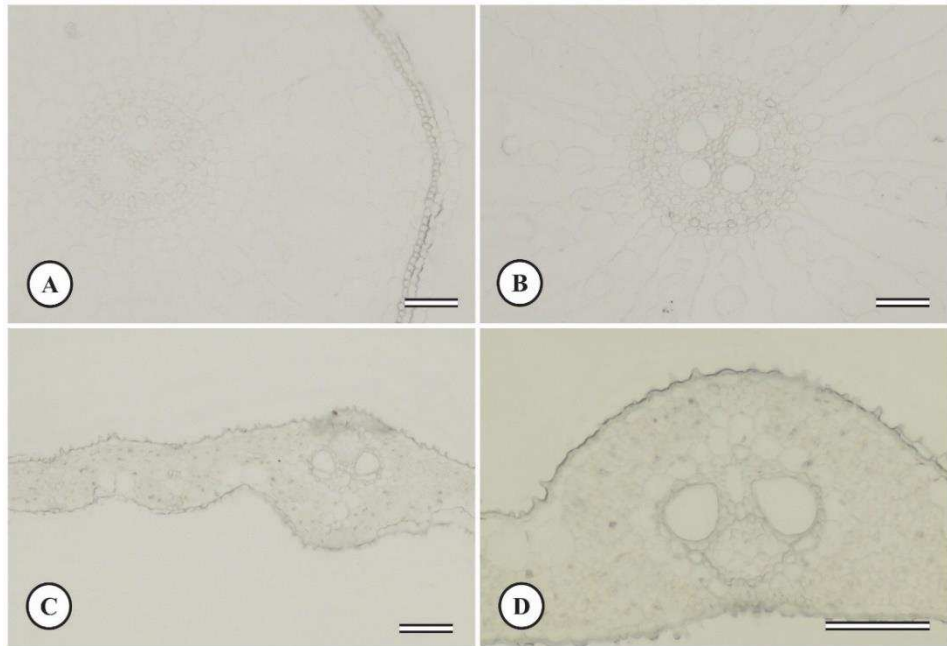
**Vaculík, M. Lux; A.;M. Luxová .; Tanimoto E.; Lichtscheidl I.** Silicon mitigates cadmium inhibitory effects in young maize plants. *Environmental and Experimental Botany*, 67:52–58, 2009.

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

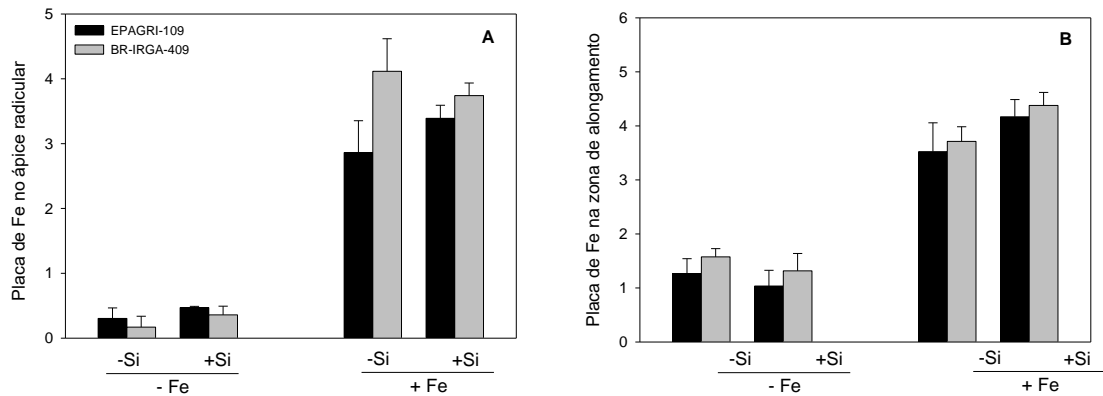
**Yamaji, N.; Ma, J. F.** Silicon transporter Lsi6 at the node is responsible for intervascular transfer of silicon in rice. *Plant Cell* 21: 2878 - 2883, 2009.

**Yamaji, N., Sakurai, G., Mitani-Ueno, N., Ma, J.F.,** Orchestration of three transporters and distinct vascular structures in node for intervascular transfer of silicon in rice. *PNAS* 112: 11401–11406, 2015.

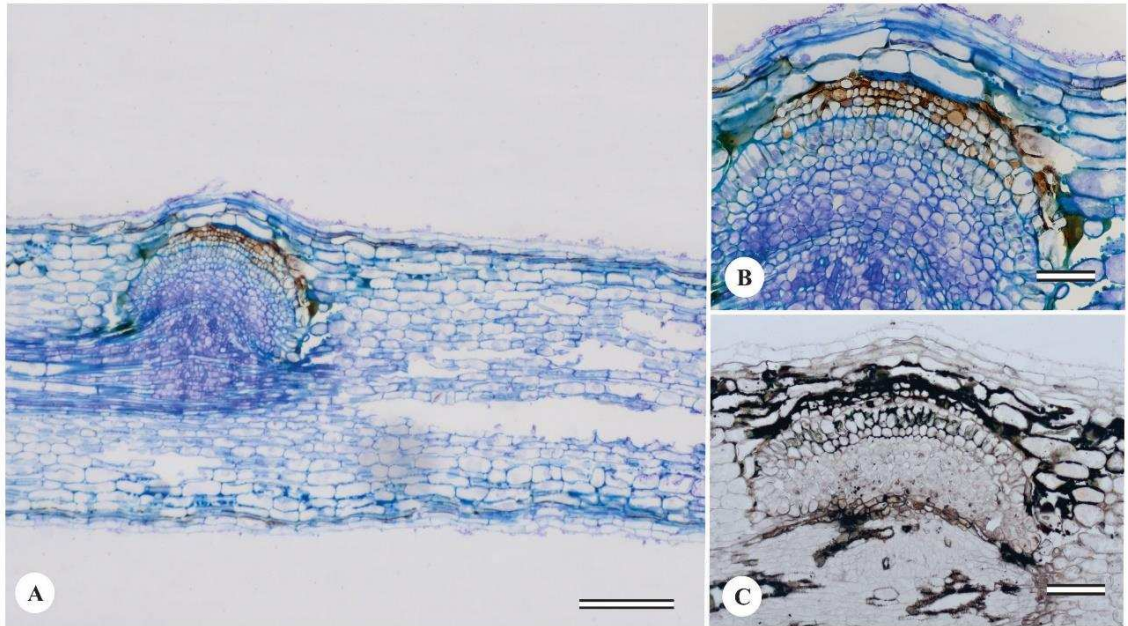
## ANEXO II – Dados suplementares



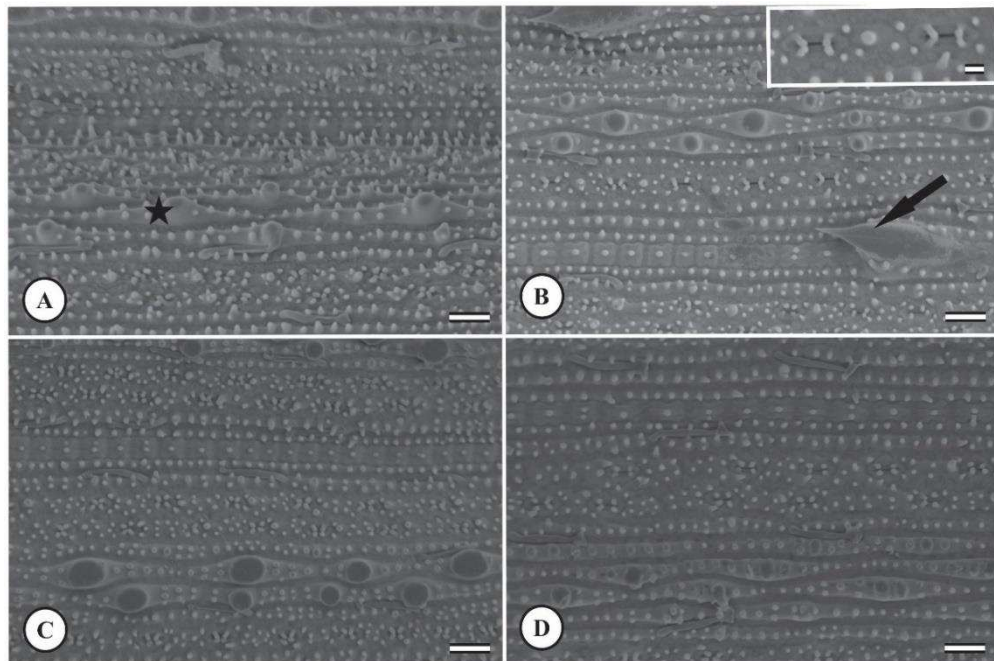
**Fig 1.** Seções transversais da raiz (A), (B) detalhe do cilindro vascular da raiz (C) região mediana da folha (D) detalhe do feixe vascular da folha da cultivar sensível (BR-IRGA-409) no tratamento Si +Fe submetida ao branco do teste histoquímico para a detecção do Fe e evidenciando resultado negativa. Aumento de 20x (a, b, c) e 40x (d). Barra = 50 µm.



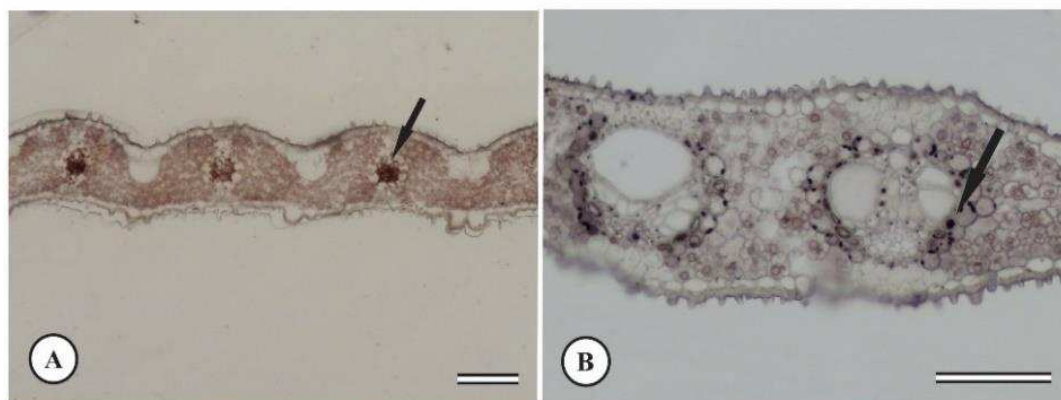
**Fig 2 .** Os efeitos do silício, Si (0 ou 2 mmol L<sup>-1</sup>: -Si ou + Si, respectivamente) e ferro, Fe (25 µmol L<sup>-1</sup> ou 5 mmol L<sup>-1</sup>: -Fe e + Fe, respectivamente), sobre a concentração de Fe adsorvido à superfície radicular (placa de Fe) em duas cultivares de arroz (EPAGRI-109 e IRGA-409 tolerante e sensível ao Fe), cultivadas em solução nutritiva. As medições foram realizadas aos 15 dias após a adição de Fe (DAA). n = 5 ± SE.



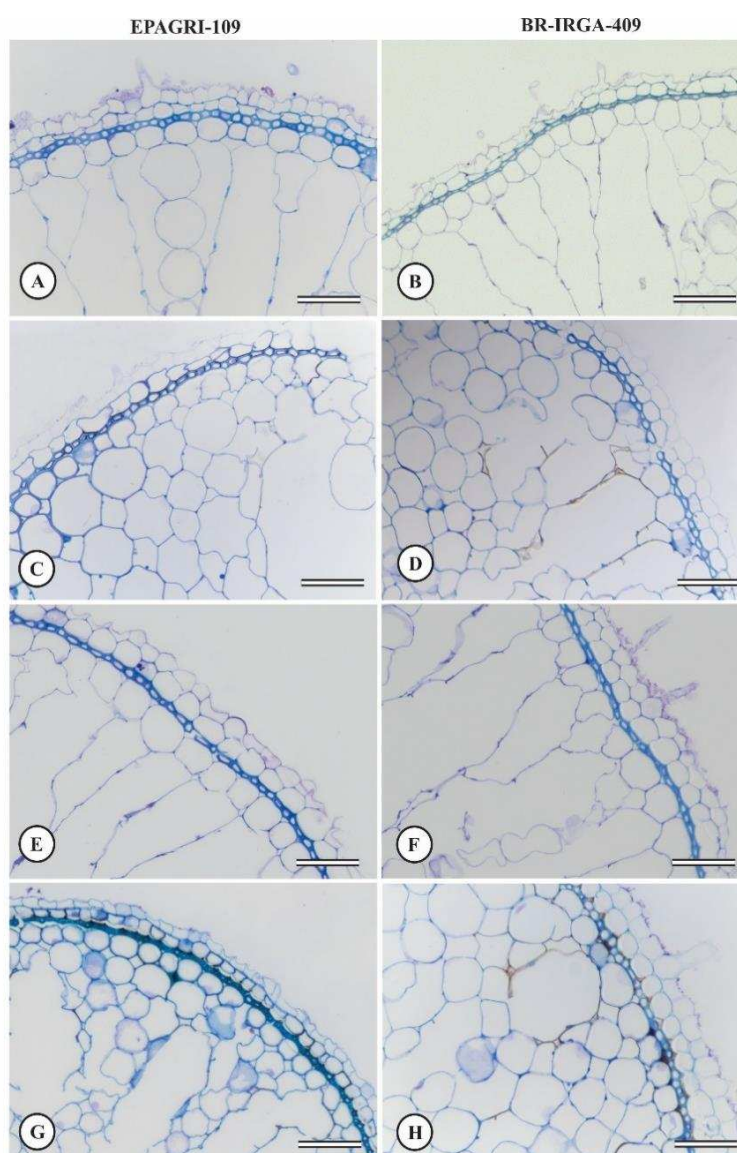
**Fig 3.** Secções longitudinais da raiz com a emissão de raiz lateral (A) detalhe da presença de conteúdo amarelo-alaranjado (B), teste histoquímico para a presença de Fe em plantas sensíveis (BR-IRGA-409) -Si +Fe. Barras= a 100  $\mu$ m e b 50  $\mu$ m.



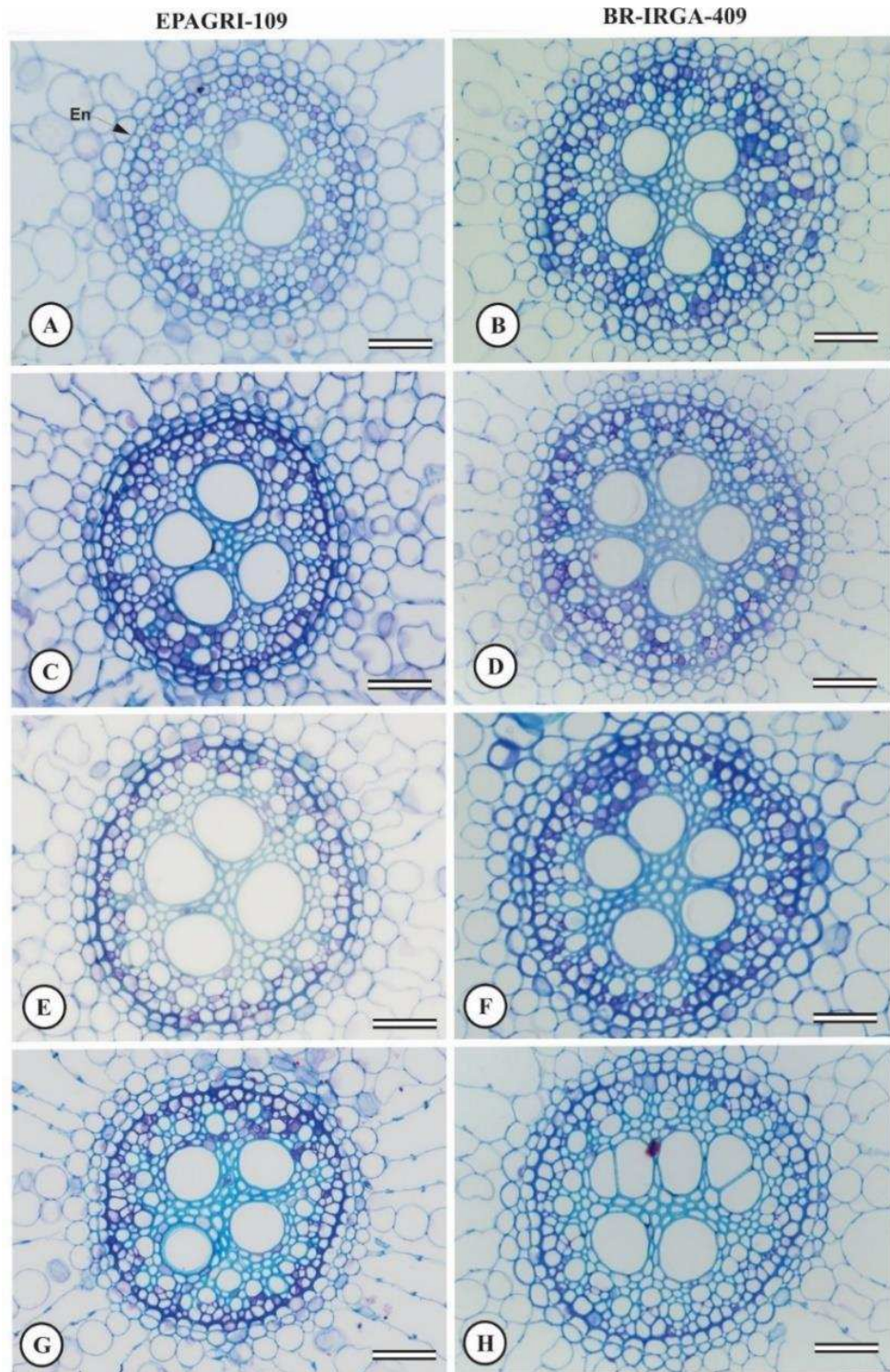
**Fig 4.** Eletromicrografias de varredura da folha evidenciando a distribuição de papilas (estrela), corpos silicosos (seta) e estômatos (detalhe) na face adaxial (A) e abaxial (B) da cultivar sensível (BR-IRGA-409) na face adaxial (C) e abaxial (D) na cultivar tolerante (EPAGRI-109) cultivadas em solução nutritiva na condição -Si-Fe. Barra = 20  $\mu$ m.



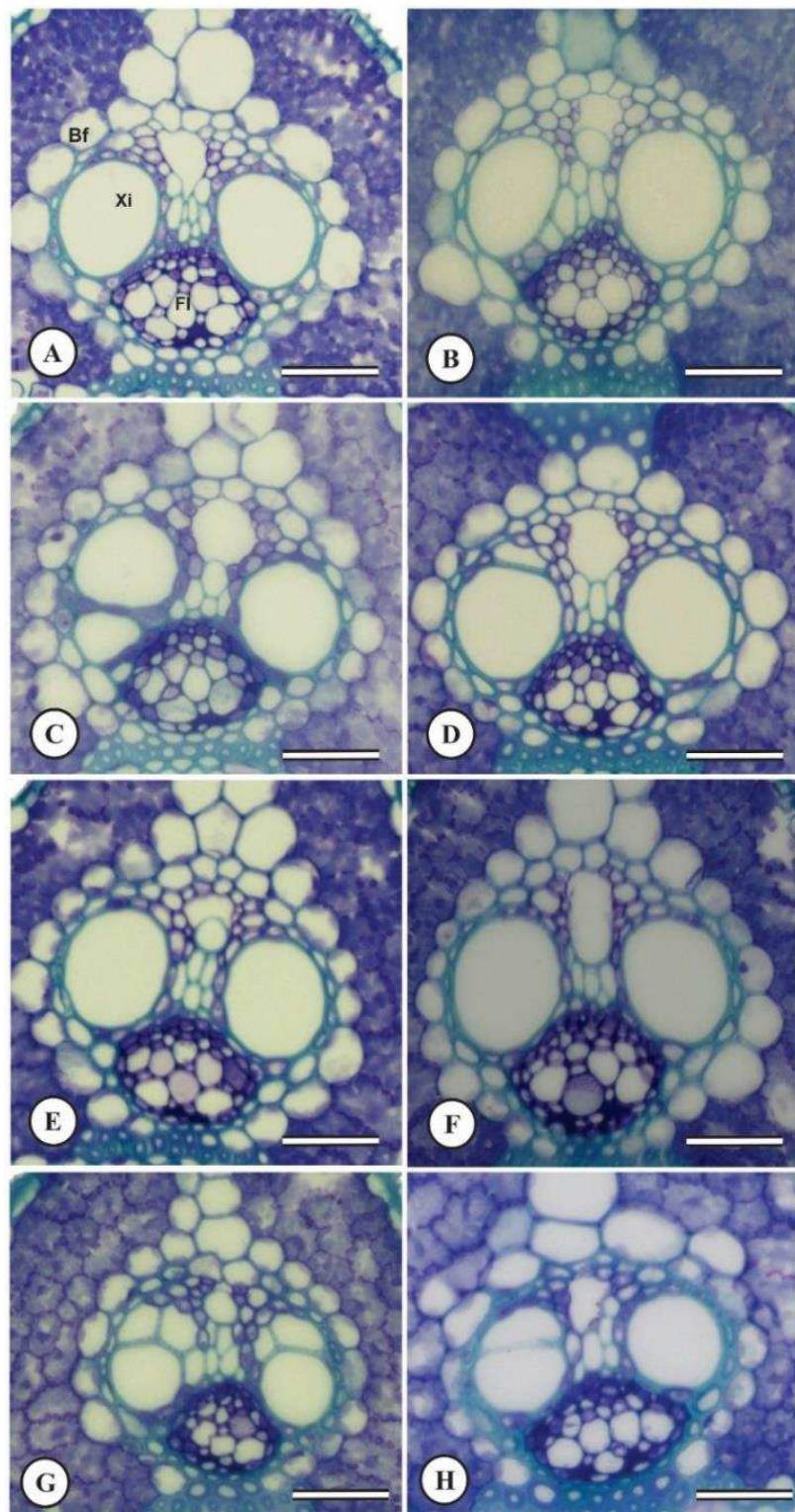
**Fig 5.** Secções transversais das folhas evidenciando a presença de Fe no feixe vascular (A-B) em plantas sensíveis (BR-IRGA-409) -Si +Fe pelo teste histoquímico. Barras= 50 µm.



**Fig 6.** Secções transversais do cilindro vascular de raízes de arroz sob os tratamentos -Si -Fe (A-B), -Si +Fe (C-D) +Si -Fe (E-F) +Si +Fe (G-H) nas cultivares tolerante (EPAGRI-109) sensível (BR-IRGA-409) respectivamente, demonstrando a retenção de Fe nas paredes da endoderme. Legenda: En= endoderme. Barra = 50 µm



**Fig 7.** Secções transversais do cilindro vascular de raízes de arroz sob os tratamentos -Si -Fe (A-B), -Si +Fe (C-D) +Si -Fe (E-F) +Si +Fe (G-H) nas cultivares tolerante (EPAGRI-109) e sensível (BR-IRGA-409) respectivamente. Legenda: En= endoderme. Barra = 50  $\mu$ m.



**Fig 8.** Secções transversais da região mediana da folha, evidenciando o feixe vascular nos tratamentos -Si-Fe (A-B), -Si +Fe (C-D) +Si-Fe (E-F) +Si+Fe (G-H) nas cultivares tolerante (EPAGRI-109) e sensível (BR-IRGA-409) respectivamente, demonstrando a reação positiva para o Fe células parenquimáticas do xilema. Bf = bainha do feixe, Xi= xilema, Fl= floema. Barra = 50 µm

### CAPITULO III

SANTOS, Martielly Santana, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2017.  
**A fertilização com Si potencializa a produtividade em arroz mesmo em condições de toxidez por Fe.** Orientador: Fábio Murilo Da Matta.

#### RESUMO

Na cultura do arroz, o sistema de cultivo alagado favorece a toxidez por excesso de ferro (Fe), com reflexos na redução do crescimento e produtividade. Por outro lado, a fertilização com silício (Si) reveste-se de efeitos positivos ao atenuar os impactos de diversos fatores de estresses, incluindo metais tóxicos. Algumas informações sugerem que o Si pode reduzir o teor de Fe em folhas e raízes de arroz, mas nada se conhece sobre como o Si poderia reverter os efeitos da toxidez por Fe sobre a produtividade. Neste estudo, objetivou-se determinar o potencial mitigatório do Si em arroz sobre a toxidez por Fe, avaliando-se o status nutricional, o acúmulo de biomassa, fotossíntese e produtividade. Para isso, duas cultivares, com tolerâncias diferenciais ao excesso de Fe, foram cultivadas em solução nutritiva não-aerada e suplementadas com Si (0 e 2 mmol L<sup>-1</sup>) e Fe (25 μmol L<sup>-1</sup> e 5 mmol L<sup>-1</sup>). Observaram-se variações mais expressivas, associadas à toxidez por Fe, nos teores de cálcio e magnésio nas folhas (parcialmente revertidas pelo Si), e alterações mínimas na composição nutricional dos grãos. A toxidez por Fe acarretou decréscimos na taxa fotossintética líquida (A) em paralelo a reduções na condutância estomática (g<sub>s</sub>) e na taxa de transporte de elétrons (ETR), em especial na cultivar sensível. Contudo, tais respostas foram revertidas parcialmente, em ambas as cultivares, pela aplicação de Si. O menor acúmulo de Fe nas plantas +Si foi associado ao maior rendimento de grãos, suportado pelo aumento em A acoplado ao incremento em g<sub>s</sub> e ETR. Além disso, os resultados sugerem que o Si tenha reduzido o impacto negativo do Fe sobre a esterilidade das espiguetas. Em síntese, recomenda-se o emprego do Si como uma estratégia de manejo efetiva para reduzir os impactos negativos da toxidez por Fe sobre o desempenho fotossintético e a produção de grãos em arroz.

## 1. INTRODUÇÃO

*Oryza sativa* L. é um cereal utilizado como alimento por mais da metade da população mundial e portanto, de particular interesse no aspecto nutricional (Rabello et al, 2008), principalmente no que se refere ao aumento da disponibilidade de micronutrientes como o Zn e Fe no grão (Sperrotto et al, 2010; Sperrotto et al, 2012). Nos vegetais, o ferro (Fe) é essencial em inúmeras reações metabólicas vitais por atuar como cofator de várias proteínas envolvidas na cadeia transportadora de elétrons da fotossíntese e da respiração (Bashir et al, 2011; Jain e Connolly, 2013; Thomine e Vert, 2013). Por outro lado, em arroz de cultivo de várzea a toxidez por Fe é um dos grandes problemas para a produtividade, pois nas condições de anaerobiose e baixo pH uma elevada quantidade de Fe, na forma reduzida ( $Fe^{2+}$ ), é liberada na solução do solo, podendo atingir níveis de toxidez que podem acarretar redução da fotossíntese e do crescimento, além de perdas de produtividade e qualidade nutricional dos grãos (Audebert e Fofana, 2009; Stein et al, 2009). Tem-se, pois, um dilema na produção do arroz de várzea, isto é, o aumento da disponibilidade de Fe nos grãos parece incompatível, a priori, com a manutenção da produtividade em condições de excesso de Fe.

No estágio vegetativo, os impactos da toxidez por Fe em cultivares de arroz vêm sendo relacionados com a redução da taxa fotossintética por meio de limitações estomáticas e não-estomáticas (Pereira et al, 2013), além de redução no rendimento quântico máximo do fotossistema II (FSII) ( $F_v/F_m$ ) associada com o aumento da fluorescência inicial ( $F_o$ ), sugerindo fotoinativação e/ou fotooxidação do FSII, fato corroborado pelo decréscimo no nível de expressão do gene *psbA* que codificam para a proteína D1 presente em PSII (Müller et al, 2015; Pinto et al, 2016). No estágio reprodutivo, o excesso Fe afeta o crescimento e desenvolvimento de diferentes cultivares de arroz, com reduções significativas na biomassa, número de perfilhos, altura das plantas e perdas no rendimento de grãos, associado à redução na fertilidade das espiguetas. A perda de produtividade em casos de toxidez por Fe pode variar de 40-45% do rendimento total, dependendo da cultivar, do tempo, intensidade do estresse e da estratégia de manejo utilizada (e.g fertilização mineral) (Olaleye et al, 2001; Audebert e Fofana, 2009; Stein et al, 2009).

Em termos nutricionais, o nível crítico de toxicidade promovida pelo Fe nos tecidos vegetais varia de 300 a 500 mg kg<sup>-1</sup> massa seca (MS) (Dobermann e Fairhurst,

2000) e o excesso de Fe, além de induzir toxidez direta, pode causar também um desequilíbrio entre os demais nutrientes, sendo esta uma resposta indireta da toxidez por Fe já verificada em cultivares de arroz nos estádios vegetativos e reprodutivos (Sahrawat, 2000; Müller et al, 2015). Nesse contexto, a toxidez por Fe atuou reduzindo os teores de potássio (K), fósforo (P) e manganês (Mn) (Müller et al, 2015), ao passo que os nutrientes como cálcio (Ca), magnésio (Mg) (Olaleye et al, 2001; Sahrawat, 2004), colbalto (Co) e cobre (Cu) (Müller et al, 2015) tiveram seus teores aumentados. Essas desordens nutricionais, em folhas e raízes, são refletidas na produtividade de diferentes cultivares de arroz (Abifarin, 1988; Olaleye et al, 2001; Audebert e Fofana, 2009; Stein et al, 2009). Isso porque a deficiência de P, K, Ca, Mg, Mn afeta o metabolismo foliar bem como o sistema radicular, ao reduzir o crescimento e o poder de oxidação, exclusão e/ou retenção do Fe nas raízes (Sahrawat, 2010). Apesar das alterações nutricionais serem evidentes em folhas e raízes, não se tem uma ideia clara do efeito da toxidez por Fe na distribuição dos nutrientes para os grãos, e se isso teria impacto na nutrição humana.

O silício (Si), por definição, não é considerado um nutriente essencial (Arno e Stout, 1939), porém é encontrado em elevada concentração em diversos membros da família Poaceae (Guerriero et al, 2016), tendo o arroz destaque devido sua importância econômica e pelo fato de acumular até 10% de Si em sua massa seca (Ma e Takahashi, 2002; Ma et al, 2011). Essa elevada capacidade de acumular Si é dada pela presença de transportadores específicos de influxo (Lsi1) e efluxo (Lsi2) no sistema radicular (Ma et al, 2006a, Ma et al, 2006b). Nesse sentido, os efeitos positivos da fertilização com Si em arroz são evidenciados no aumento da produtividade (Detmann et al, 2012; Lavinsky et al, 2016) e da tolerância a vários estresses bióticos (Rodrigues et al, 2004; Perez et al, 2014) e abióticos, tais como metais tóxicos (Sanglard et al, 2014; Song et al, 2014; Abbas et al, 2015).

Os impactos negativos de metais tóxicos (e.g. Cd, Zn, Al, Fe, As) têm sido atenuados com a fertilização com Si, por reduzir a absorção, translocação e bioconcentração desses metais/metalóides na parte aérea (Vaculík et al, 2012; Sanglard et al, 2014; Rizwan et al, 2016). Nesse sentido, Sanglard et al (2014), estudando o efeito do arsênio (As) em arroz, demonstraram que o Si atua melhorando a fotossíntese via aumento na condutância mesofílica ( $g_m$ ), sendo posteriormente verificado que tais aspectos foram associados a alterações mínimas no metabolismo central do carbono (Sanglard et al, 2016). A atenuação da toxidez de Fe pelo Si está

relacionada à potencialização do sistema antioxidante, redução na peroxidação lipídica, teor de Fe nas folhas e placa de Fe no sistema radicular, o que implica em menor impacto do Fe no crescimento das plantas fertilizadas com Si (Dufey et al, 2014; Chalmardi et al, 2014). Esses resultados indicam o potencial do Si em atenuar os efeitos da toxidez em arroz; não obstante, essas informações foram obtidas em plantas no estágio vegetativo e, portanto, pouco ou nada se sabe sobre os potenciais efeitos mitigatórios do Si em relação ao excesso de Fe sobre o crescimento e a fisiologia de plantas de arroz no estágio reprodutivo, bem como sobre os possíveis impactos do Si sobre a composição nutricional dos grãos.

Em termos de produtividade, em condições não estressantes, inicialmente foi demonstrado por Ma et al (1989) que a fertilização com Si, no estágio reprodutivo, especificamente na formação da panícula, promove o aumento no número de grãos por panícula, sem, contudo, afetar o peso de mil grãos. Recentemente, essa resposta foi associada a modificações fisiológicas e moleculares induzidas pelo Si em genótipos de arroz cv. 'Oochikara' e seu mutante low silicone 1 (Lsi1) defectivo para a absorção de Si (Lavinsky et al, 2016). Detmann et al (2012) verificaram que o efeito do Si sobre a produtividade está, primordialmente, relacionado ao aumento da taxa fotossintética líquida (A) em paralelo a aumentos na condutância foliar, com reflexos em maior rendimento de grãos nas plantas suplementadas com Si. Ademais, Lavinsky et al (2016) demonstraram que o aumento no índice de colheita associado com o maior número de grãos e peso de 1000 grãos, em plantas de arroz suplementadas com Si, foi associado ao aumento em A acoplado com aumento da condutância estomática ( $g_s$ ) e da capacidade bioquímica de fixar  $CO_2$  induzidas pelo aumento da relação fonte-dreno. Associadas às modificações fotossintéticas, a regulação positiva da expressão do gene Lsi6, verificada pelos autores, favoreceu o maior teor de Si nas panículas em desenvolvimento, sugerindo que o nível de Si nas panículas desempenha papel importante no aumento da produção e enchimento de grãos por mecanismos ainda desconhecidos.

Diante dos fatos supraexpostos, o presente trabalho teve por objetivos responder aos seguintes questionamentos: i) A fertilização com Si poderia mitigar os efeitos da toxidez por ferro, com reflexos positivos na fotossíntese? ii) O Si, por amenizar os efeitos da toxidez por Fe, via redução na absorção desse metal, aumentaria o teor de nutrientes em folhas e grãos? iii) Quais os impactos da fertilização com Si em termos de produtividade em arroz cultivado sob excesso de Fe?

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Condições de cultivo e imposição dos tratamentos

O experimento foi conduzido em casa de vegetação no Campus da Universidade Federal de Viçosa (649m, 20°45'20"S e 42°52'40"N), MG, Brasil. Foram utilizadas duas cultivares de arroz (*Oryza sativa* L.: BR-IRGA-409, caracterizada como sensível ao estresse por Fe, e EPAGRI-109, como tolerante (Stein et al, 2009; Stein et al, 2014). As sementes foram lavadas em solução de hipoclorito de sódio por 1 min, seguidas de lavagem em água desionizada por 3 min. Foram germinadas em papel-filtro por 4 dias no escuro, sendo posteriormente transferidas para a luz artificial (180  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  fótons) sob um ciclo de 12/12 h diurno/noite, com umidade relativa de 60/75% e temperatura de 30°C, por um período de 11 dias.

As plantas foram cultivadas em hidroponia, sem aeração, em vasos de 5 L, contendo solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950) com modificações, constituída de 1,0 mmol L<sup>-1</sup> KNO<sub>3</sub>; 0,25 mmol L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,1 mmol L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>Cl; 0,5 mmol L<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 1,0 mmol L<sup>-1</sup> Ca (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>; 0,30  $\mu\text{mol L}^{-1}$  CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O; 0,33  $\mu\text{mol L}^{-1}$  ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 11,5  $\mu\text{mol L}^{-1}$  H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>; 3,5  $\mu\text{mol L}^{-1}$  MnCl<sub>2</sub>. 4H<sub>2</sub>O; 0,1  $\mu\text{mol L}^{-1}$  (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub> Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>.4H<sub>2</sub>O; 25  $\mu\text{mol L}^{-1}$  FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O e 25  $\mu\text{mol L}^{-1}$  EDTA disódico. As plantas foram fertilizadas com Si (ao longo de todo o experimento), nas concentrações de sem (-Si) ou 2 mmol L<sup>-1</sup> (+Si), fornecido na forma de ácido monossilícico (H<sub>4</sub>SiO<sub>4</sub>), obtido pela passagem do silicato de potássio através de uma coluna trocadora de cátions (AMBERLITE IR-120B; H<sup>+</sup> form; Sigma- Aldrich, São Paulo, Brasil). O pH da solução de cultivo foi ajustado diariamente para 5,0, utilizando-se NaOH (1 mol L<sup>-1</sup>) ou HCl (1 mol L<sup>-1</sup>). O experimento foi conduzido em casa de vegetação climatizada, como temperatura ajustada para 30 ( $\pm$  2) °C, sob iluminação natural ( $\sim$  1500  $\mu\text{mol fótons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ).

Plantas com 75 dias após o transplantio (estádio reprodutivo), foram submetidas ao tratamento de Fe, aplicado na forma de Fe-EDTA (FeSO<sub>4</sub>), na concentração de 25  $\mu\text{M}$  (plantas-controle) ou 5 mM, correspondente à condição ambiental de excesso de Fe, típica da região Sul do Brasil, a segunda maior produtora de arroz do país (Stein et al, 2014). O Fe foi aplicado de progressiva (a cada 0, 5 mmol L<sup>-1</sup>), sendo a dose de 5 mmol L<sup>-1</sup> adicionada no estágio R2 (enlogamento da panícula), e as plantas foram cultivadas sob esse estresse por 42 dias até o estágio R6 (enchimento do grão). Neste momento, foram feitas as amostragens e avaliações buscando-se

caracterizar os aspectos fotossintéticos, nutricionais, de crescimento e de produtividade.

## **2.2 Quantificação do Si e Fe em folhas, raízes e grãos**

Folhas bandeiras e raízes foram coletadas e secas em estufa com circulação forçada de ar a 60 °C, até massa constante. Após a determinação dos parâmetros de produção de grãos, parte foi direcionada para a quantificação dos nutrientes. Os grãos foram secos a 60°C e posteriormente, separados em casca e endosperma, utilizando-se de um descascador mecânico de arroz. Em seguida, o material vegetal foi triturado e a concentração de Si foi determinada colorimetricamente (Dallagnol et al, 2011). O Fe foi extraído por digestão nitroperclórica e sua concentração determinada por espectrometria de absorção atômica (Malavolta et al, 1989).

## **2.3 Composição mineral das folhas, raízes e grãos**

As plantas foram separadas em parte aérea e radicular, sendo as raízes lavadas em solução contendo Ditionibo-Citrato-Bicarbonato (DCB) para a remoção do Fe adsorvido na raiz. Para os grãos foi feita a separação da casca e endosperma, utilizando-se de um descascador mecânico de arroz. Folhas-bandeira, raízes, casca e endosperma foram secos em estufa a 60°C, até atingir massa constante, sendo posteriormente moídos com o auxílio de esferas metálicas em um disruptor celular tipo Mini Bead Beater. Os nutrientes Ca, Mg, Fe, Zn, Cu, P e K foram extraídos por digestão nitroperclórica, de acordo com Malavolta et al (1989). Os teores de Ca, Mg, Fe, Zn, foram determinados por espectrometria de absorção atômica; P, por colorimetria, utilizando o método da vitamina C.

## **2.4 Medições de trocas gasosas foliares e a análise das limitações à fotossíntese**

A taxa fotossintética líquida (A) e a taxa de transpiração foliar (E) foram medidas simultaneamente aos parâmetros de fluorescência da clorofila a, utilizando-se de um analisador de gases a infravermelho (modelo LI 6400XT LI-COR, Lincoln, NE, EUA), equipado com um fluorômetro, (LI-6400-40, LICOR Inc.). As mensurações foram feitas em folha-bandeira completamente expandida, das 10:00 às 14:00 h, sob radiação fotossinteticamente ativa (RFA) artificial de 1000  $\mu\text{mol}$  fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  em nível de folha, e 400  $\mu\text{mol}$   $\text{CO}_2 \text{mol}^{-1}$  ar. A concentração intercelular de  $\text{CO}_2$  ( $C_i$ ) e a condutância estomática ao vapor de água ( $g_s$ ) foram calculadas pelo referido

equipamento a partir dos valores de A e E (Von Caemmerer e Farquhar, 1981). Todas as medições foram realizadas fixando-se a temperatura do bloco em 25°C, e o déficit de pressão de vapor mantido em cerca de 1,0 kPa, enquanto a quantidade de luz azul foi de 10% de RFA para otimizar a abertura estomática.

A eficiência fotoquímica do fotossistema II ( $\phi_{\text{FSII}}$ ) foi determinada pela medição do estado estável da fluorescência ( $F_s$ ) e da fluorescência máxima ( $F'_m$ ), utilizando-se de um pulso de luz saturante de aproximadamente  $8000 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , seguindo procedimentos descritos por Genty et al, (1989). A taxa aparente de transporte de elétrons (ETR) foi estimada como  $\text{ETR} = (\phi_{\text{FSII}} \times \text{PPFD} \times f \times \alpha$  onde  $f$  é um fator que explica a partição de energia entre PSII e PSI e é assumido como sendo 0,5, o que indica que a energia de excitação é distribuída igualmente entre os dois fotossistemas, e  $\alpha$  é a absorção pelos tecidos fotosintéticos das folhas é assumido como sendo 0,84 (Maxwell e Johnson, 2000).

## 2.5 Crescimento e produtividade

Para a determinação dos parâmetros de crescimento e produção de grãos, as plantas foram coletadas e separadas em raízes, colmos, folhas, panículas e grãos. A área foliar total foi mensurada com um medidor de área (Area Measurement System, Delta-T Devices, Cambridge, UK). Em seguida, o material vegetal foi submetido à secagem em estufa a 60°C com circulação forçada de ar, durante 72 h (massa constante) e, com base no valor de biomassa seca, obtido para cada uma das diferentes partes, foram estimados os seguintes parâmetros: biomassa seca de raízes (BR), de colmos (BC), de folhas (BF), de grãos (BG) e biomassa total (BT). A área foliar específica foi calculada pela razão entre área foliar total e a biomassa foliar. Os parâmetros de produtividade foram avaliados a partir da contagem e pesagem dos grãos, sendo obtidos: peso de 1000 grãos (cheios), porcentagem de grãos cheios, índice de colheita, números de grãos por planta e números de grãos por panícula (cheios e vazios).

## 2.6 Análise estatística

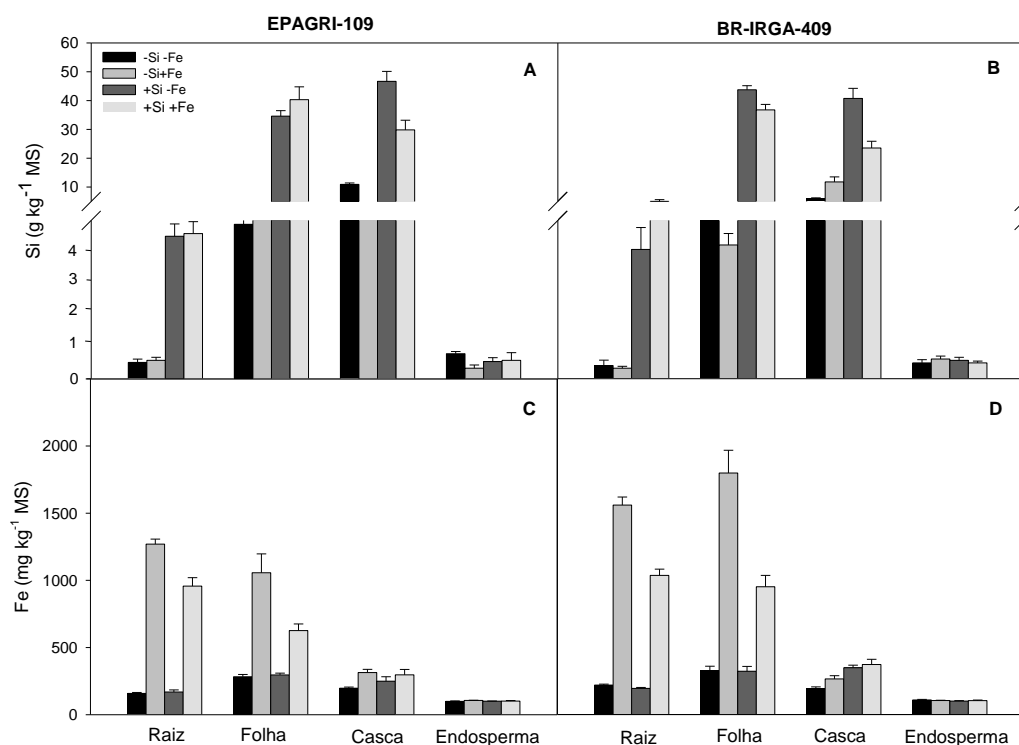
O experimento foi montado em um delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial triplo 2x2x2 (duas cultivares x duas concentrações de Fe x duas concentrações de Si), com seis repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância (three-way ANOVA com todos os fatores avaliados com fatores fixos)

usando-se o procedimento MIXED do SAS (versão 9.1) e um  $\alpha= 0.05$ . Quando não ocorreu interação significativa, o MIXED foi usado para interpretar o efeito de dependência entre os fatores. A análise de regressão foi usada para avaliar a relação entre algumas variáveis. Ademais, todas as variáveis de fotossíntese e produtividade foram avaliadas pela análise de componentes principais (PCA), definidos pelas variáveis que melhor se correlacionaram com os eixos 1 e 2 do PCA. A confiabilidade do procedimento PCA foi atestada com a soma total de variabilidade percentual contabilizada pelo primeiro componente principal (PC1: eixo 1, separação entre tratamentos de Fe) e segundo (PC2: eixo 2, separação entre tratamentos de Si). Todas as variáveis dentro do PCA com maior contribuição para 50% ( $\Sigma r^2 > 0,5$ ) foram consideradas relevantes para a separação entre os grupos de fatores individuais de cada cultivar de arroz, sendo o agrupamento realizado por meio da análise multivariada baseando-se nas distâncias euclidianas. Todas as análises de PCA, bem como a análise de agrupamento, foram feitas utilizando o pacote "factoextra" do software R (Kassambara e Mundt, 2016).

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 O Si reduziu o teor de Fe em folhas e raízes, mas sem afetar o seu teor nos grãos

Nas cultivares EPAGRI-109 e BR-IRGA-409, tolerante e sensível a toxidez por Fe, respectivamente, os maiores teores de Fe foram verificados nas folhas e raízes, porém apenas aumentos discretos nos teores de Fe foram observados na casca (Fig 1C-D). Como esperado, a fertilização com Si promoveu aumento nos teores de Si em raízes, folhas e cascas (Tabela 1, Fig 1A-B). Por outro lado, o papel do Si na mitigação da toxidez por Fe foi evidenciado nas plantas +Si+Fe, que apresentaram níveis de Fe significativamente reduzidos nas folhas e raízes em ambas as cultivares (Tabela 1 e Fig. 1C-D), observando-se, ainda, um aumento discreto no teor de Fe na casca, mas sem efeito do Si (interação Si x Fe não significativa). Ressalte-se que, independentemente do tratamento aplicado, nenhuma alteração nos teores de Si e/ou Fe foram verificadas no endosperma (Tabela 1).



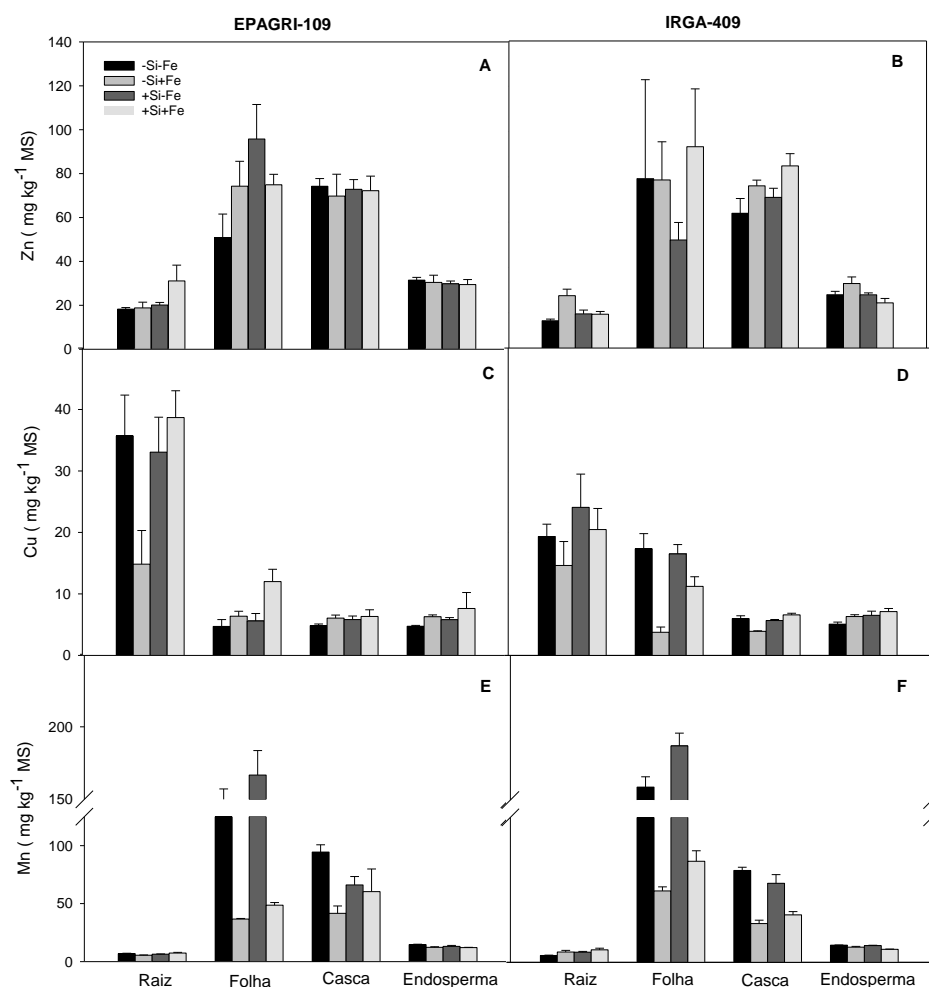
**Fig 1.** Efeitos do silício, Si (0 ou 2 mmol L<sup>-1</sup>: -Si ou +Si, respectivamente) e do ferro, Fe (25 μmol L<sup>-1</sup> e 5 mmol L<sup>-1</sup>: -Fe e +Fe, respectivamente) nos teores de Si (A-B) e de Fe (C-D) em raiz, folha-bandeira, casca e grão, em duas cultivares de arroz (EPAGRI-109 e BR-IRGA-409, tolerante e sensível a toxidez de Fe), cultivadas em solução nutritiva. As medições foram realizadas aos 42 dias após a adição de Fe. n = 5 ± SE.

**Tabela 1.** Resultado da ANOVA (ns = não significativo; \*P< 0.05; \*\*P <0.01; \*\*\*P<0.001) para os efeitos do silício (Si), Ferro (Fe) e cultivar (Ct) e suas interações para as concentrações de fósforo (P), potássio (K), Cálcio (Ca), Magnésio (Mg), Enxofre (S), Cobre (Cu), (Zn) zinco (K), Manganês (Mn) em raízes, folhas, raízes e casa de arroz após 42 dias da aplicação de Fe.

	Parâmetros	Si	Fe	Si x Fe	Ct	Si x Ct	Fe x Ct	Si x Fe x Ct
<b>Raiz</b>	Si	***	***	***	ns	ns	***	***
	Fe	***	***	***	**	*	*	ns
	P	***	ns	**	ns	*	ns	ns
	K	ns	**	ns	**	*	ns	ns
	Ca	***	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	Mg	ns	ns	ns	***	ns	ns	ns
	S	*	ns	ns	**	ns	ns	ns
	Zn	ns	**	ns	ns	*	ns	*
	Cu	ns	ns	ns	***	ns	ns	ns
	Mn	*	ns	ns	**	ns	ns	ns
	<b>Folha</b>	Si	***	ns	ns	ns	ns	**
Fe		***	***	***	***	ns	***	ns
P		ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
K		ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Ca		***	***	***	ns	*	ns	ns
Mg		ns	***	*	**	ns	ns	ns
S		**	***	*	**	ns	ns	ns
Zn		ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Cu		***	***	ns	***	**	***	ns
Mn		**	*	***	***	ns	***	ns
<b>Casca</b>		Si	***	***	***	ns	ns	ns
	Fe	***	**	ns	ns	**	ns	ns
	P	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	K	**	*	*	ns	ns	ns	ns
	Ca	***	***	**	ns	***	ns	ns
	Mg	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	S	ns	***	*	ns	ns	ns	ns
	Cu	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	Zn	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	Mn	ns	*	ns	ns	ns	ns	ns
	<b>Endosperma</b>	Si	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Fe		ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
P		ns	*	*	ns	ns	ns	ns
K		ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Ca		ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Mg		**	ns	*	*	*	ns	ns
S		***	***	ns	ns	ns	ns	ns
Zn		ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Cu		ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Mn		ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

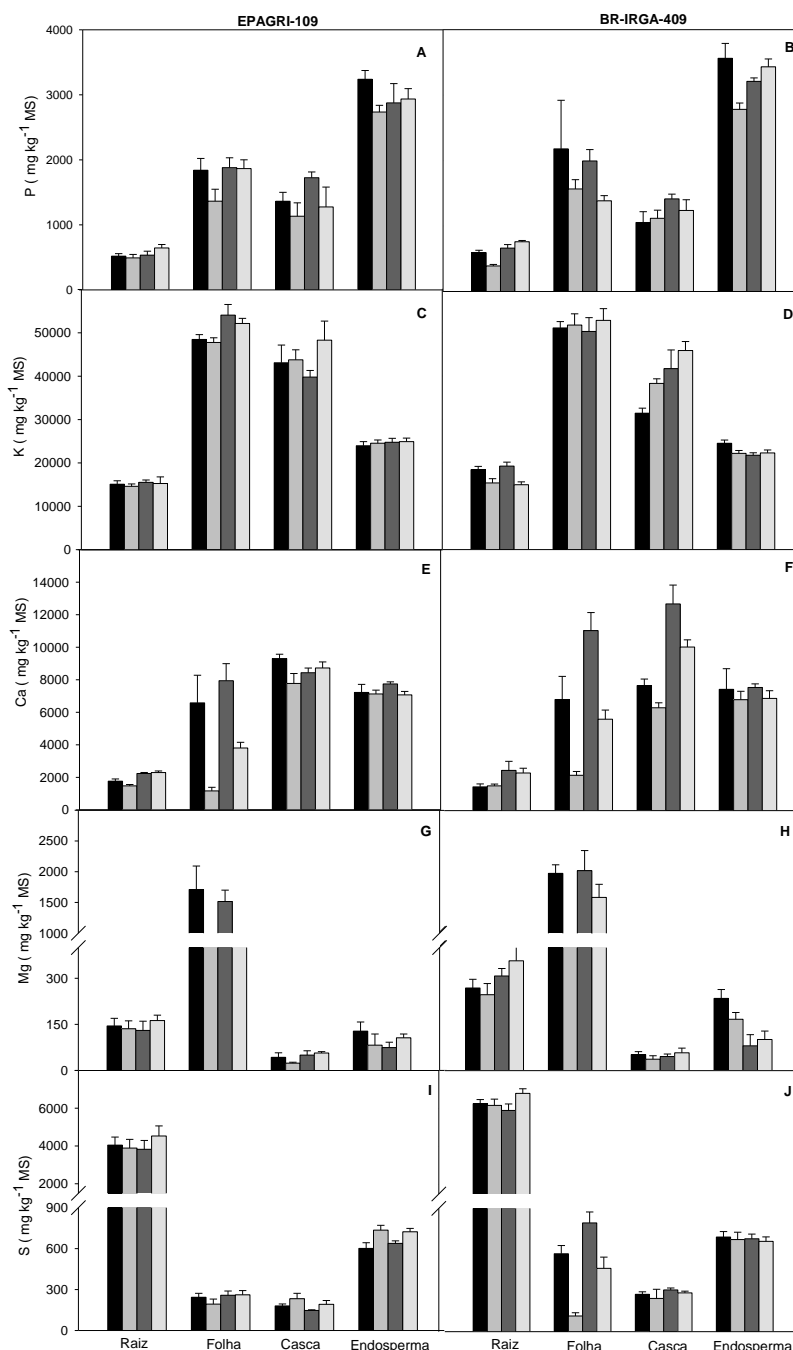
### 3.2. O excesso de Fe afetou especialmente a composição mineral das folhas, fato parcialmente revertido pelo Si

Nas raízes, o excesso de Fe foi associado a alterações apenas nos teores de K (redução na cultivar sensível ao Fe) e Zn (aumento nas plantas +Si+Fe na cultivar tolerante e nas plantas -Si+Fe na cultivar sensível, interação Si x Fe x Ct significativa). Na casca, houve tendência de aumentos nos teores de K pelo excesso de Fe, mais nas plantas +Si+Fe que nas -Si+Fe (interação Si x Fe significativa). Houve ainda variações significativas nos teores de Ca, especialmente na cultivar sensível ao Fe, bem como alterações significativas, porém mínimas, nos teores de Si. No grão, houve apenas alterações discretas nos teores de P (reduções em P nas plantas -Si+Fe em relação às -Si-Fe; interação Si x Fe significativa).



**Fig 2.** Efeitos do silício, Si (0 ou 2 mmol L<sup>-1</sup>: -Si ou +Si, respectivamente) e do ferro, Fe (25 μmol L<sup>-1</sup> e 5 mmol L<sup>-1</sup>: -Fe e +Fe, respectivamente) na concentração de Zn (A-B), Cu (C-D), Mn (E-F) na folha-bandeira, raízes, casca e endosperma em duas cultivares de arroz (EPAGRI-109 e BR-IRGA-409, tolerante e sensível à toxidez de Fe) cultivadas em solução nutritiva. Medições foram realizadas aos 42 dias após adição de Fe. n = 5 ± SE.

Efeitos mais contundentes do excesso de Fe foram observados nas folhas, com alterações nos teores de Ca, Mg, S, Cu e Mn. De modo geral, os teores desses elementos se reduziram nas plantas +Fe, porém muito menos marcadamente quando essas plantas foram fertilizadas com Si. Saliente-se que, quantitativamente, as maiores reduções (>50%) foram observadas nos teores de Ca e Mg em ambas cultivares, e S na cultivar sensível ao Fe (Fig 3).



**Fig 3.** Efeitos do silício, Si (0 ou 2 mmol L<sup>-1</sup>: -Si ou +Si, respectivamente) e do ferro, Fe (25 µmol L<sup>-1</sup> e 5 mmol L<sup>-1</sup>: -Fe e +Fe, respectivamente) na concentração de P (A-B), K (C-D), Ca ( E-F), Mg (G-H) e S (I-J) nas folhas bandeiras e nas raízes, em duas cultivares de arroz (EPAGRI-109 e BR-IRGA-409, tolerante e sensível à toxidez de Fe) cultivadas em solução nutritiva. Medições foram realizadas aos 42 dias e após adição de Fe. n = 5 ± SE

### 3.3. Os impactos negativos do Fe sobre a fotossíntese e produtividade foram parcialmente mitigados pelo Si

Em condições não-estressantes (-Fe), as cultivares diferiram entre si em algumas características morfológicas e de produtividade, registrando-se, na cultivar tolerante ao excesso de Fe em relação à sensível, maior número de folhas e área foliar, biomassa de raiz, número de panículas, peso de 1000 grãos, índice de colheita e número de grãos por planta (Tabela 2 e 3). A toxidez por Fe acarretou decréscimos expressivos, em ambas as cultivares, nos parâmetros de trocas gasosas e fluorescência da clorofila a ( $g_s$ , E, ETR,  $q_p$  e  $F'_v/F'_m$ ), na biomassa total e biomassa de folhas, colmos e raízes e nos parâmetros agronômicos de produtividade (biomassa de grãos, peso de mil grãos, porcentagem de grãos cheios, número de grãos por planta e índice de colheita). Essas reduções foram mais acentuadas na cultivar sensível ao Fe (41% contra 32% na tolerante plantas -Si+Fe comparadas com as -Si-Fe) e, com exceção da biomassa dos órgãos vegetativos, tais reduções foram parcialmente revertidas pela aplicação de Si, com destaque para a maior biomassa de grãos das plantas +Si+Fe em relação à das -Si+Fe (44% e 26%, respectivamente, para as cultivares sensível e tolerante ao excesso de Fe).

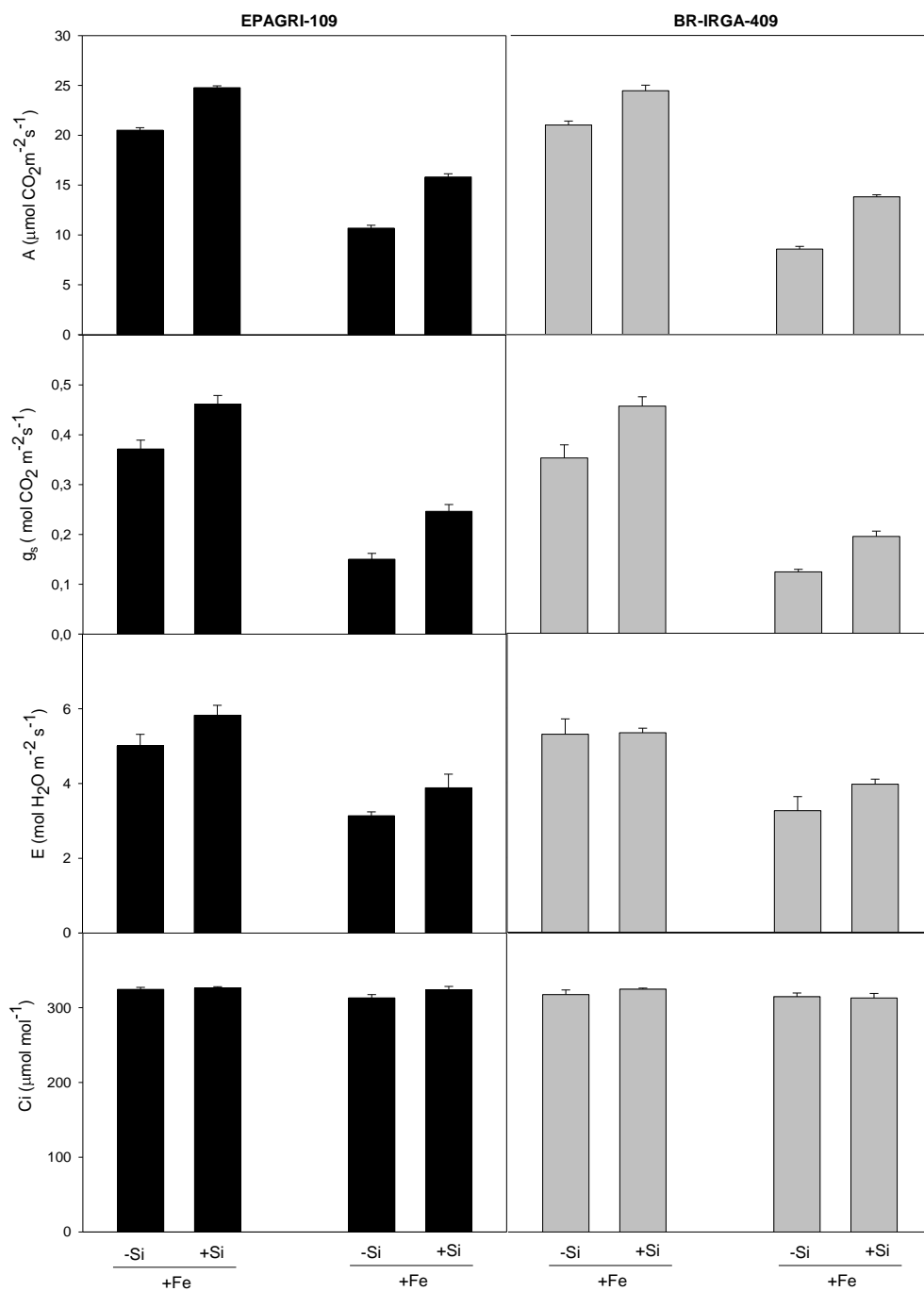
**Tabela 2.** Resultado da ANOVA ( ns = não significativo; \*P< 0.05; \*\*P <0.01; \*\*\*P<0.001) para os efeitos do silício (Si), Ferro ( Fe) e cultivar (Ct) e suas interações para as concentrações de Si e Fe; taxa de assimilação de CO<sub>2</sub> (A), condutância estomática ( $g_s$ ), transpiração (E); taxa de transporte de elétrons (ETR), rendimento quântico máximo do fotossistema II (  $F_v/F_m$ ); rendimento quântico efetivo do fotossistema II (  $F'_v/F'_m$ ); quenching fotoquímico ( $q_p$ ); e quenching não-fotoquímico ( $q_n$ ) e para os parâmetros agronômicos de crescimento nas cultivares de arroz contrastantes a toxidez por Fe.

Parâmetros	Si	Fe	Si x Fe	Ct	Si x Ct	Fe x Ct	Si x Fe x Ct
A	***	***	*	***	ns	***	ns
$g_s$	***	***	*	*	ns	ns	ns
E	*	***	ns	ns	ns	ns	ns
ETR	***	***	***	**	ns	ns	ns
$F_v/F_m$	**	ns	ns	***	**	ns	ns
$F'_v/F'_m$	***	***	*	ns	ns	ns	***
$q_p$	*	***	ns	***	ns	ns	**

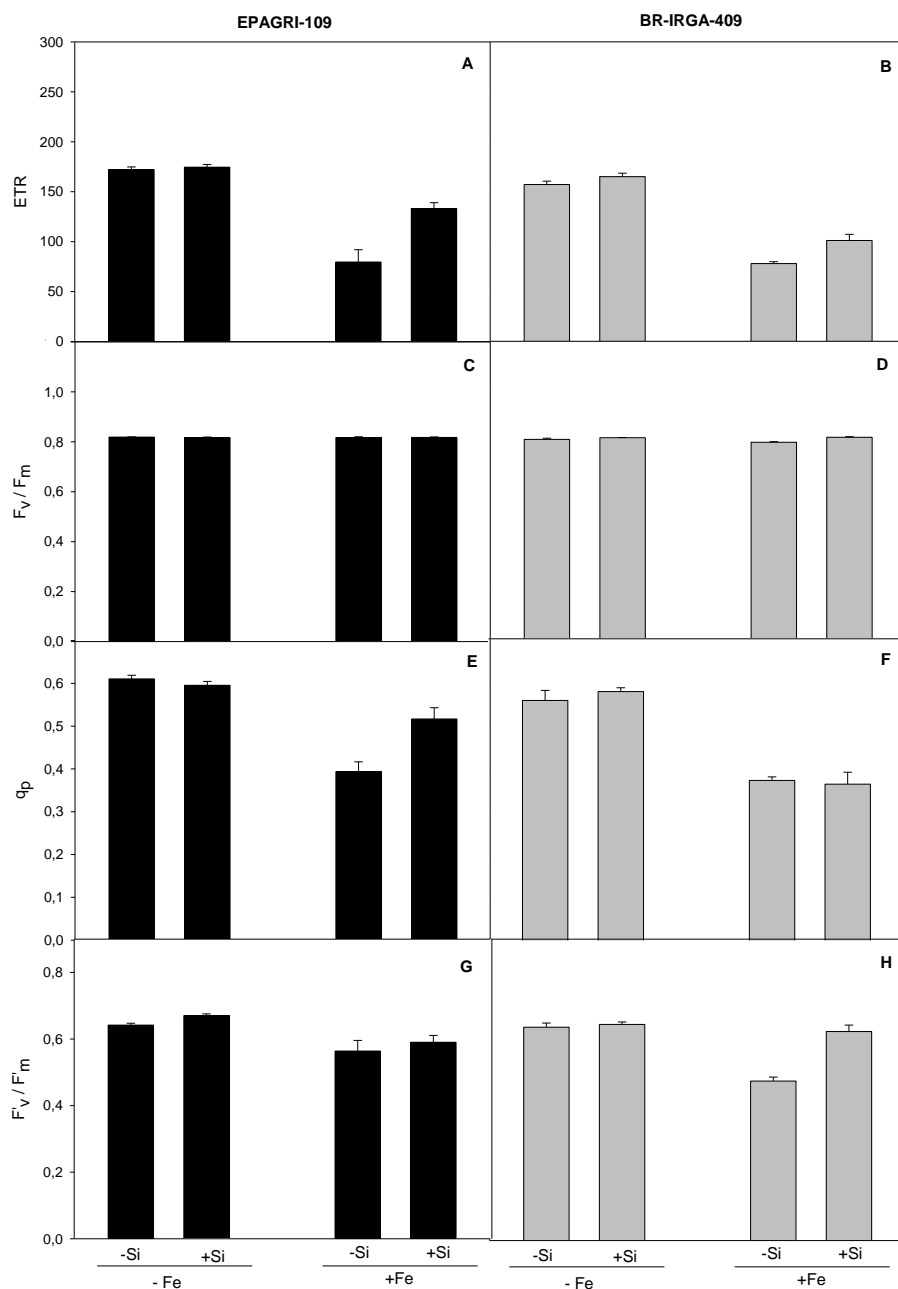
Continuação tabela 2...

Parâmetros	Si	Fe	Si x Fe	Ct	Si x Ct	Fe x Ct	Si x Fe x Ct
Altura (cm)	ns	***	ns	**	ns	ns	ns
Nº de Folhas	ns	***	ns	***	ns	ns	ns
Nº de Perfilhos	ns	***	ns	***	ns	ns	***
Nº de Panículas	ns	ns	ns	***	ns	*	ns
AF (m <sup>2</sup> )	ns	***	ns	***	ns	ns	ns
AFE (m <sup>2</sup> kg <sup>-1</sup> )	ns	***	ns	**	ns	ns	<b>ns</b>
Biomassa de Folhas (g)	ns	***	ns	***	ns	ns	ns
Biomassa de Colmos (g)	ns	***	ns	***	ns	ns	ns
Biomassa de raiz (g)	ns	***	ns	ns	ns	*	ns
Razão raiz/parte aérea(g)	ns	***	ns	ns	ns	**	ns
Biomassa total (g)	ns	***	ns	***	ns	ns	ns
Biomassa de grãos (g)	***	***	***	***	ns	ns	ns
Peso de 1000 grãos (g)	ns	*	ns	***	ns	ns	ns
Grãos cheios (%)	***	***	***	***	***	ns	ns
Índice de colheita (g. g <sup>-1</sup> )	***	***	*	***	**	*	ns
Nº de grãos. Planta <sup>-1</sup>	***	***	***	***	ns	ns	**
Nº de grãos. Panícula <sup>-1</sup>	***	***	*	*	ns	ns	ns

Independentemente dos tratamentos com Fe, registre-se que o Si teve um efeito positivo direto sobre A e  $g_s$  (em paralelo a uma invariabilidade em ETR nas plantas - Fe), cujos valores foram, em média 20% maiores nas plantas +Si-Fe em relação às suas contrapartes -Si-Fe. Em paralelo, observou-se uma maior produção de grãos nas plantas +Si-Fe. O aumento da biomassa de grãos nas plantas +Si-Fe foi associado ao maior número de grãos por planta e maior porcentagem de grãos cheios, sem, contudo, haver efeito sobre o peso de 1000 grãos. Estes resultados foram refletidos em maior índice de colheita nas plantas +Si das duas cultivares em relação ao das plantas -Si. Independentemente dos tratamentos aplicados, A correlacionou-se significativamente com  $g_s$  ( $r^2 = 0,87$ ,  $P \leq 0,01$ ) e com ETR ( $r^2 = 0,92$ ,  $P \leq 0,01$ ) (Fig 1A-B Suplementar). Ademais, houve também estreita relação entre os teores de Fe com A ( $r^2 = 0,86$ ), e com  $g_s$  ( $r^2 = 0,79$ ) (Fig 1C-D Suplementar).



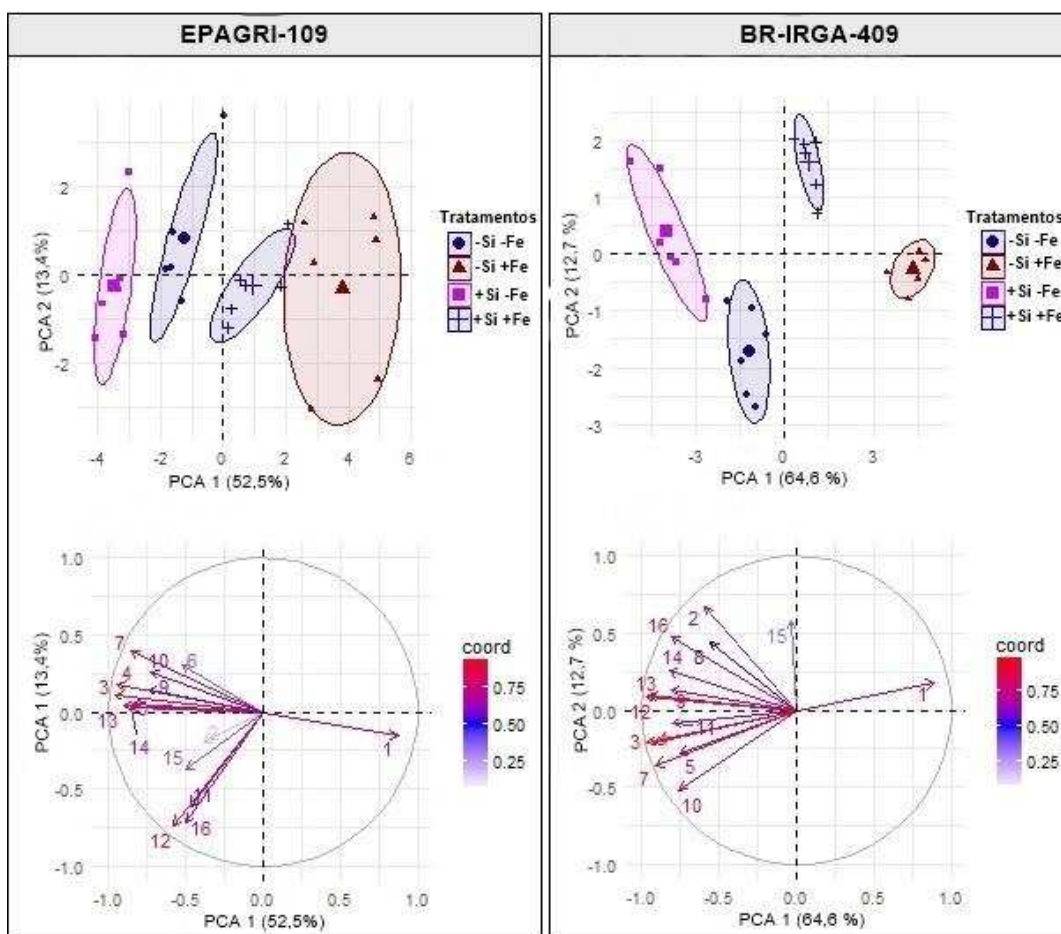
**Fig 4-** Efeitos do silício, Si (0 ou 2 mmol L<sup>-1</sup>: -Si ou +Si, respectivamente) e do ferro, Fe (25 μmol L<sup>-1</sup> e 5 mmol L<sup>-1</sup>: -Fe e +Fe, respectivamente) na taxa assimilatória de CO<sub>2</sub>, A (A e B), condutância estomática, g<sub>s</sub> (C e D), taxa transpiratória, E (E e F), concentração interna de CO<sub>2</sub>, C<sub>i</sub> (G-H) em duas cultivares de arroz (EPAGRI-109 e BR-IRGA-409, tolerante e sensível a toxidez de Fe) cultivadas em solução nutritiva. Medições foram realizadas aos 42 dias após adição de Fe (DAAT). n = 6 ± SE.



**Fig. 5** Os efeitos do silício, Si (0 ou 2 mmol L<sup>-1</sup>: -Si ou + Si, respectivamente) e ferro, Fe (25 µmol L<sup>-1</sup> e 5 mmol L<sup>-1</sup>: -Fe e + Fe, respectivamente), sobre a taxa de transporte de elétrons, ETR (A-B), razão da eficiência quântica máxima da clorofila a,  $F_v/F_m$  (C-D), e coeficiente de extinção fotoquímica,  $q_p$  (E-F), eficiência da captura da energia de excitação nos centros de reação PSII abertos,  $F_v'/F_m'$  (G-H), em duas cultivares de arroz (EPAGRI-109 e BR-IRGA-409, tolerante e sensível à toxidez de Fe) cultivadas em solução nutritiva. Medições foram realizadas aos 42 dias após adição de Fe (DAAT). n= 6 ± SE.

Objetivando-se ter uma visão integrada do desempenho das plantas, em termos de fotossíntese e produção de grãos em resposta aos tratamentos aplicados, procedeu-se a uma análise de componentes principais (CP) com as variáveis que responderam

significativamente aos fatores Si e/ou Fe. Os dois primeiros CPs explicaram 65,9% e 77,3% (respectivamente para a cultivar tolerante e a sensível ao excesso de Fe) da variância total observada. Os resultados dessa análise evidenciam os efeitos negativos do Fe sobre o desempenho fotossintético e produção de grãos, bem como os efeitos mitigatórios do Si em atenuar esses efeitos, especialmente na cultivar sensível (correlações negativas entre o teor de Fe e todas as variáveis analisadas, observando-se o oposto com o Si). Ademais, dentro de cada cultivar, as plantas foram agrupadas (e separadas) em função dos quatro tratamentos aplicados. Registre-se que o grupo das plantas +Si-Fe e -Si+Fe foram localizados nos extremos do CP1, enquanto os grupos de plantas -Si-Fe e +Si+Fe foram localizados mais proximamente à origem do biplano. Saliente-se, uma vez mais, a melhor separação entre grupos na cultivar sensível que na tolerante ao excesso de Fe, realçando os efeitos mais contundentes do Fe, e da mitigação desses efeitos pelo Si, sobre o desempenho fotossintético e dos parâmetros de produção.



**Fig 6.** Análise de componentes principais (PCA) para as variáveis dos parâmetros fotossintéticos da folha-bandeira e de produtividade em duas cultivares de arroz (EPAGRI-109 e BR-IRGA-409, tolerante e sensível a toxidez por Fe) cultivadas em solução nutritiva e submetidas quatro tratamentos combinados de Si e Fe (Si-Fe-, Si + Fe-, Si-

Fe + e Si + Fe +). As numerações são definidas da seguinte forma: ferro foliar (1), silício foliar (2) taxa fotossintética (3), condutância estomática (4), taxa transpiratória (5), concentração interna de CO<sub>2</sub> (6), taxa de transporte de elétrons (7), rendimento quântico máximo do fotossistema II (8); rendimento quântico efetivo do fotossistema II (9); coeficiente de extinção fotoquímico (10), peso de 1000 grãos (11), biomassa de grãos (12), porcentagem de grãos cheios (13), número de grãos planta<sup>-1</sup> (14), número grão panícula<sup>-1</sup> (15), índice de colheita (16). Elipse apresenta intervalo de confiança de 95% para cada tratamento. Medições foram realizadas aos 42 dias após adição de Fe. n = 5

**Tabela 3** - Os efeitos do silício, Si (0 ou 2 mmol L<sup>-1</sup>: -Si ou + Si, respectivamente) e ferro, Fe (25 µmol L<sup>-1</sup> e 5 mmol L<sup>-1</sup> : -Fe e + Fe, respectivamente), sobre componente de rendimento em arroz em duas cultivares de arroz (EPAGRI-109, tolerante ao Fe e BR-IRGA-409, sensível ao Fe) cultivadas em solução nutritiva. Parâmetros obtidos após aos 42 dias da adição de Fe (DAAT). n= 6 ± SE

Parâmetros	EPAGRI-109				IRGA-409			
	-Fe		+Fe		-Fe		+Fe	
	-Si	+Si	-Si	+Si	-Si	+Si	-Si	+Si
Altura (cm)	95 ± 0.28	94 ± 1.11	90 ± 0.63	92 ± 0.76	97 ± 1.9	98 ± 0.67	93 ± 0.49	94 ± 0.52
Nº de Folhas	154 ± 4.03	163 ± 9.5	101 ± 2.35	104 ± 2.17	115 ± 4.98	118 ± 7.03	74 ± 3.17	73 ± 2.32
Nº de Perfilhos	37 ± 1.3	40 ± 0.92	37 ± 0.87	38 ± 2.47	34 ± 1.21	36 ± 0.87	24 ± 1.04	25 ± 0.82
Nº de Panículas	31.0 ± 0.8	31.2 ± 1.8	32.4 ± 0.99	32.4 ± 0.78	26.2 ± 0.18	26.4 ± 0.36	22.0 ± 0.4	23.4 ± 0.46
AF (m <sup>2</sup> )	0,27 ± 0,01	0,27 ± 0,01	0,19 ± 0,01	0,19 ± 0,01	0,22 ± 0,01	0,21 ± 0,02	0,12 ± 0,01	0,12 ± 0,01
AFE (m <sup>2</sup> kg <sup>-1</sup> )	9,64 ± 0,54	9,64 ± 0,34	7,50 ± 0,30	7,79 ± 0,53	8,81 ± 0,25	8,50 ± 0,61	5,60 ± 0,19	5,69 ± 0,3
Biomassa de folhas (g)	29.22 ± 1.08	28.39 ± 0.82	24.90 ± 0.76	25.44 ± 1.3	24.93 ± 1.04	24.87 ± 0.58	21.66 ± 1.50	21.31 ± 0.45
Biomassa de colmos (g)	76.01 ± 4.50	78.56 ± 1.83	56.27 ± 1.80	58.15 ± 1.88	68.9 ± 2.32	67.54 ± 1.50	48.93 ± 3.52	50.40 ± 2.08
Biomassa de raiz (g)	16.40 ± 1.21	17.33 ± 0.96	11.70 ± 0.21	12.07 ± 0.68	14.61 ± 0.84	16.57 ± 0.36	7.44 ± 0.54	8.94 ± 0.44
Biomassa total (g)	192.48 ± 7.19	205.42 ± 1.64	140.91 ± 9.10	156.27 ± 3.59	149.87 ± 2.51	165.66 ± 1.55	102.38 ± 5.37	115.82 ± 2.96
Razão raiz/parte aérea (g)	0.156 ± 0.011	0.163 ± 0.013	0.145 ± 0.003	0.145 ± 0.009	0.153 ± 0.005	0.179 ± 0.004	0.106 ± 0.007	0.125 ± 0.008
Biomassa de grãos (g)	70,84 ± 1,78	81.13 ± 1.64	48,02 ± 1.85	60,59 ± 2,17	41,43 ± 1,65	56,67 ± 2.24	24,35 ± 0.2	35,18 ± 1.08
Peso de 1000 grãos (g)	26.32 ± 0.27	26.09 ± 0.19	23.51 ± 1.08	25.70 ± 0.14	23.35 ± 0.73	23.33 ± 0.68	18.36 ± 1.02	21.72 ± 0.44
Grãos cheios (%)	67.86 ± 0.27	72.40 ± 2.48	57.31 ± 1.22	60.66 ± 1.03	61.09 ± 0.38	79,69 ± 1.74	48.17 ± 0.45	57.13 ± 1.53
Índice de colheita (g. g <sup>-1</sup> )	0.37 ± 0.006	0.39 ± 0.007	0.34 ± 0.007	0.36 ± 0.01	0.28 ± 0.01	0.34 ± 0.01	0.24 ± 0.01	0.30 ± 0,006
Nº grãos. Planta <sup>-1</sup>	3617.6 ± 96.0	4103.2 ± 59.9	3268.6 ± 101.3	3550.2 ± 92.9	2616,0 ± 49.5	3138.5 ± 69.93	2384.7 ± 85.4	2524.8 ± 37.3
Nº grãos. Panícula <sup>-1</sup>	116.89 ± 3.11	133.77 ± 7.71	100.90 ± 0.99	110.09 ± 4.79	103.55 ± 2.18	121.4 ± 3.42	103.95 ± 1.94	108.14 ± 2.93

#### 4. DISCUSSÃO

Neste estudo, foram confrontadas duas cultivares de arroz com sensibilidades diferenciais ao excesso de Fe. A cultivar EPAGRI-109 (tolerante) exibiu maior capacidade para acumular biomassa e maior produção de grãos em relação à cultivar BR-IRGA-409 (sensível ao excesso de Fe). Diferenças na tolerância à toxidez de Fe parecem estar, em parte, associadas à ineficiência da cultivar sensível de evitar o excesso do metal nos tecidos quando comparada com a cultivar tolerante (Silveira et al, 2007). Maiores produções de grãos da cultivar EPAGRI-109 foram associadas não somente a uma maior área foliar, mas também a uma maior capacidade fotossintética por unidade de massa foliar (portanto, maior capacidade fotossintética em nível de planta inteira), e de uma maior partição de assimilados para os grãos (maior índice de colheita).

Independentemente da cultivar, os teores de Fe encontrados nas folhas-bandeira e raízes de ambas cultivares, expostas ao Fe, estavam acima do nível crítico de toxicidade em plantas, que varia de 300 a 500 mg kg<sup>-1</sup> massa seca (MS) (Dobermann e Fairhurst, 2000). Na casca, a toxidez promoveu aumento de Fe na cultivar sensível, fato visualmente observado pela mudança na coloração dos grãos (Fig 2 Suplementar), mas nenhuma alteração no teor de Fe, como de nenhum outro nutriente à exceção do P na cultivar sensível, foi verificada nos grãos de ambas cultivares. Diante destes resultados, pode-se sugerir a existência de ajustes finos na partição, remobilização e compartimentalização dos nutrientes a serem armazenados no grão, independentemente da quantidade total de Fe absorvido e/ou translocado, evidenciando uma homeostase nutricional no grão. Portanto, parece haver pouco espaço para se incrementar os níveis de Fe no grão de arroz e, pois, espera-se que o cultivo dessa espécie em áreas com excesso de Fe seja impactado em termos de crescimento e produção (ver abaixo), mas sem gerar qualquer benefício apreciável em termos de segurança alimentar via aumentos dos teores de Fe no grão.

Os efeitos da toxidez de Fe sobre desequilíbrios nutricionais em arroz são relativamente bem estabelecidos (Vahl, 1991; Stein et al, 2009; Stein et al, 2014), conforme aqui observado com os decréscimos nos teores de Ca, Mg, S, Cu e Mn, especialmente nas folhas. Essa resposta é um tipo de interação antagonista promovida pela inibição da absorção de cátions pelo excesso de Fe (Vahl, 1991). Ademais, efeitos da toxidez de Fe sobre a produção, incluindo menor crescimento, aumento da

esterilidade das espiguetas, redução do enchimento de grãos e menor biomassa de grãos, são consistentes com os resultados aqui apresentados. Além dessas alterações, observaram-se reduções de  $A$  em paralelo a decréscimos em  $g_s$  e em ETR. Os decréscimos em ETR podem estar associados à menor concentração de clorofilas (dados não mostrados) em resposta ao excesso de Fe e à deficiência de Mg. Note-se que menores valores de ETR foram associados a menores valores de  $q_p$ , sugerindo um menor uso da energia radiante absorvida em processos fotoquímicos, bem como a uma menor dissipação de energia na forma de calor (decréscimos em  $F'_v/F'_m$ ), fatos que sugerem alterações nos centros de reação do FSII (Logan et al, 2007). Em todo o caso, visto que a razão  $F_v/F_m$  permaneceu em torno de 0,80, sugere-se que não tenha ocorrido fotoinibição da fotossíntese nas plantas sob excesso de Fe (Logan et al, 2007).

Acredita-se que este seja o primeiro estudo a explorar os efeitos do Si, como uma estratégia de mitigação dos efeitos da toxidez por Fe, na fase reprodutiva do arroz. Os benefícios gerados pela presença de Si foram relacionados, pelo menos em parte, ao decréscimo no acúmulo de Fe na raiz e parte aérea, particularmente na cultivar sensível. Em todo o caso, mesmo nas plantas +Si, os teores de Fe nas folhas-bandeira e raízes estavam dentro dos níveis caracterizados como de toxidez por Fe (Dobermann e Fairhurst, 2000). Desde que o Si não afetou a área foliar das plantas, sugere-se que a maior biomassa de grãos (26-44%) e maior índice de colheita das plantas +Si+Fe em relação aos das plantas -Si+Fe devem ter sido associados especialmente a uma maior capacidade fotossintética por unidade de área foliar (acoplada a um aumento em  $g_s$  e ETR) e, secundariamente, a um discreto estímulo (6-9%) à formação de mais grãos por planta. Convém ressaltar que a fertilização com Si, per se, tem sido associada a incrementos na produção e no índice de colheita em arroz cultivado em condições não estressantes; e, para suportar essa maior produção, parece haver um incremento da capacidade fotossintética mediado por incrementos na condutância estomática ou mesofílica (Detmann et al, 2012; Lavinsky et al, 2016). Esses resultados, obtidos com outras cultivares de arroz, são consistentes com os dados deste estudo. Tomados em conjunto, os presentes resultados sugerem que os efeitos positivos do Si sobre a fotossíntese e a produção foram manifestados mesmo nas plantas +Fe, especialmente na cultivar sensível, como bem mostra as análises dos componentes principais.

Em síntese, os presentes resultados suportam a hipótese de que o Si é capaz de amenizar os impactos negativos da toxidez por Fe em plantas de arroz no estágio reprodutivo, por reduzir o acúmulo de Fe em folhas e raízes, o que indiretamente

mitigou a deficiência nutricional múltipla (especialmente as deficiências de Ca e Mg). Registre-se que a toxidez por Fe, independentemente do Si, pouco ou nada afetou a composição nutricional dos grãos. Enfatiza-se que, em termos de produtividade, o menor teor de Fe nas plantas +Si foi associado ao maior rendimento de grãos, que por sua vez foi suportado pelo aumento em A, acoplado a incrementos em  $g_s$  e em ETR. Além disso, é provável que o Si tenha reduzido o impacto negativo do Fe sobre a esterilidade das espiguetas, em função do possível papel do Si na fertilidade das panículas (Lavisnky et al, 2016). Diante desses fatos, recomenda-se o emprego de fertilizantes silicatados, em áreas arrozícolas sob excesso de Fe, como uma estratégia de manejo efetiva para reduzir os impactos negativos da toxidez por Fe sobre o desempenho fotossintético e a produção de grãos em arroz.

## 5. REFERENCIAS

- Abbas, T.; Balal, R.M.; Shahid, M.A.; Pervez, M.A.; Ayyub, C.M.; Aqueel, M.A.; Javaid, M.M.** Silicon-induced alleviation of NaCl toxicity in okra (*Abelmoschus esculentus*) is associated with enhanced photosynthesis, osmoprotectants and antioxidant metabolism. *Acta Physiologia Plantarum*, 37: 2-15, 2015.
- Arnon, D. I.; Stout, P. R.** The essentiality of certain elements in minute quantity for plants with special reference to copper. *Plant Physiology*, Washington, 14: 371-375, 1939.
- Audebert, A.; Fofana, M.** Rice yield gap due to iron toxicity in West Africa. *Journal Agronomy & Crop Science*, 195: 66-76, 2009.
- Abifarin, A.O.** Grain yield loss due to iron toxicity. *West Africa Rice Development Association Technical Newsletter*, Bouaké, v.8, p.1-2, 1988.
- Bashir, K.; Ishimaru, Y.; Shimo, H.; Kakei, Y.; Senoura, T.; Takahashi, R.** Rice phenolics efflux transporter 2 (PEZ2) plays an important role insolubilizing apoplasmic iron. *Soil Science and Plant Nutrition*, 57: 803-812. 2011.
- Chalmardi, Z.C.; Abdolzadeh, A.; Sadeghipour, H.K.** Silicon nutrition potentiates the antioxidant metabolism of rice plants under iron toxicity. *Acta Physiologiae Plantarum*, 36:493-502, 2014.
- Dallagnol, L.J.; Rodrigues F.A.; DaMatta, F.M.; Mielli, M.V.B.; Pereira, S.C.** Deficiency in silicon uptake affects cytological, physiological, and biochemical events in the rice *Bipolaris oryzae* interaction. *Phytopathology*, 101:92-104, 2011.
- Detmann, K. C.; Araújo, W. L.; Martins, S. C. V.; Sanglard, L. M.V.P.; Reis, J. V.; Detmann, E.; Rodrigues, F. A; Nunes-Nesi, A.; Fernie, A. R.; DaMatta, F. M.** Silicon nutrition increases grain yield, which, in turn, exerts a feed-forward stimulation of photosynthetic rates via enhanced mesophyll conductance and alters primary metabolism in rice. *New Phytologist*, 196: 752-762, 2012.
- Dobermann, A.; Fairhurst, T.** Rice: nutrient disorders and nutrient management. Manila: International Rice Research Institute, 2000. 191 p.
- Dufey, S. G.; Ingabire, A.; Lutts, S.; Bertin, P.** Silicon application in cultivated rices (*Oryza sativa* L and *Oryza glaberrima* Steud) alleviates iron toxicity symptoms through the reduction in iron concentration in the leaf tissue. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 200: 132-142, 2014.
- Genty, B.; Briantais, J.M.; Baker, N.R.** The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron-transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta*, 990:87-92, 1989.
- Guerriero, G.; Hausman, J.F.; Legay, S.** Silicon and the plant extracellular matrix. *Frontiers in Plant Science*, 7:463, 2016.

**Jain, A.; Connolly, E.L.** Mitochondrial iron transport and homeostasis in plants. *Frontiers in Plant Science*. 4: 1-6, 2013.

**Kassambara, A. F. Mundt.** Factoextra: extract and visualize the results of multivariate data analyses. R package version 1.0.3. disponível em: <https://cran.r-project.org/web/packages/factoextra/index.html>, 2016.

**Lavinsky, A.O.; Detmann, K.C.; Reis, J.V.; Ávila, R.T.; Sanglard, M. L.; Pereira, L.F.; Sanglard, L.M.V.P.; Rodrigues, F. A.; Araújo, W. L.; DaMatta, F.M.** Silicon improves rice grain yield and photosynthesis specifically when supplied during the reproductive growth stage, *Journal of Plant Physiology* 206, 125–132, 2016.

**Logan BA, Kornyejev D, Hardison J, Holaday AS.** The role of antioxidante enzymes in photoprotection. *Photosynthesis Research*, 88: 119-132, 2006.

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

**Ma, J.F.; Takahashi, E.** Soil, fertilizer, and plant silicon research in Japan, Amsterdam, the Netherlands: Elsevier Science, 2002.

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

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

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

**Ma, J.F., Yamaji, N.** A cooperative system of silicon transport in plants. *Trends Plant Science*. 20, 435–442, 2015

**Malavolta, E.; Vitti, G. C.; Oliveira, S. A.** Evaluation of the nutritional state of plants: principles and applications. Potafos, Piracicaba pp. 201, 1989.

**Müller, C.; Kuki, K, N.; Pinheiro, D.T.; Souza, L.R.S.; Silva, A.I.S.; Loureiro, M.E.; Oliva, M.A.; Almeida, A.M.** Differential physiological responses in rice upon exposure to excess distinct iron forms. *Plant Soil*, 391: 123-138, 2015.

**Olaleye, A.O.; Tabi, F.O.; Ogunkunle, A.O.; Singh, B.N.; Sahrawat, K.L.** Effect of toxic iron concentrations on the growth of lowlands rice. *Journal of Plant Nutrition*, 24:3, 441-457, 2001.

**Perez, C. E. A.; Rodrigues, F. Á.; Moreira, W. R.; DaMatta, F. M.** Leaf gas exchange and chlorophyll a fluorescence in wheat plants supplied with silicon and infected with *Pyricularia oryzae*. *Phytopathology*, 104: 143-149, 2014.

**Pereira, E.G.; Oliva, M.A.; Siqueira-Silva, A.I.; Rosado-Souza, L.; Pinheiro, D.T.; Almeida, A.M.** Tropical rice cultivars from lowland and upland cropping

systems differ in iron plaque formation. *Journal of Plant Nutrition*, 37:1373–1394, 2014.

**Pereira, E.G.; Oliva, M. A.; Rosado-Souza, L.; Mendes, G. C.; Colares, D, S.; Stopato, C. H.; Almeida, A. M.** Iron excess affects rice photosynthesis through stomatal and non-stomatal limitations. *Plant Science*, 201:81-89, 2013.

**Pinto, S.S.; Souza, A.E.; Oliva, M.A.; Pereira, E.G.** Oxidative damage and photosynthetic impairment in tropical rice cultivars upon. *Scientia Agricola*, 73: 217-226, 2016.

**Rabello, A.R.; Guimarães, C.M.; Rangel, P.H.N.; Silva, F.R.; Seixas, D.; Souza, E.; Brasileiro, A.C.M.; Spehar, C.R.; Ferreira, M. E.; Mehta, A.** Identification of drought-responsive genes in roots of upland rice (*Oryza sativa* L). *BMC Genomics*, 9:1-13 2008.

**Rizwan, M.; Meunier, J.D.; Davidian, J.C.; Pokrovsky, O.S.; Bovet, N.; Keller, C.** Silicon alleviates Cd stress of wheat seedlings (*Triticum turgidum* L. cv. Claudio) grown in hydroponics. *Environmental Science and Pollution Research*, 33:1414–1427.2016.

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

**Sanglard, L. M.V.P.; Martins, S. C. V.; Detmann, K. C., Silva, P.E.M.; Lavinsky, A.O.; Silva, M.M.; Detmann, E., Araújo, W. L.; DaMatta, F. M.** Silicon nutrition alleviates the negative impacts of arsenic on the photosynthetic apparatus of rice leaves: an analysis of the key limitations of photosynthesis. *Physiologia Plantarum*, 152: 355-366, 2014.

**Sanglard, L. M.V.P.; Detmann, K. C.; Martins, S. C. V.; Teixeira, R. A.; Pereira, L. F.; Sanglard, M.L.; Fernie, A. R.; Araújo, W. L.; DaMatta, F. M.** The role of silicone in metabolic acclimation of rice plants challenged with arsenic. *Environmental and Experimental Botany*. 123: 22-36, 2016.

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

**Sahrawat, K.L.** Iron toxicity in wetland rice and the role of other nutrients. *Journal of Plant Nutrition*, 27:1471–1504, 2004.

**Stein, R.J.; Duarte, G.L.; Spohr, M.G.; Lopes, S.I.G.; Fett, J.P.** Distinct physiological responses of two rice cultivars subjected to iron toxicity under field conditions. *Annals of Applied Biology*, 154: 269-277, 2009.

**Stein, R.J.; Lopes, S.I.G.; Fett, J.P.** Iron toxicity in field-cultivated rice: contrasting tolerance mechanisms in distinct cultivars. *Theoretical and Experimental Plant Physiology*, 16:135-146 2014.

**Silveira, V.C.; Oliveira, A.P.; Sperotto, R.A.; Espindola, L.S.; Amaral, L.; Dias, J.F.; Cunha, J.B.; Fett, J.P.** Influence of iron on mineral status of two rice (*Oryza sativa* L.) cultivars. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 19:127-139, 2007.

**Singh, B.P.; Das, M.; Prasad, R.N.; Ram, M.** Characteristics of Fe-toxic soils and affected plants and their correction in acid haplaquents of meghalaya. *Rice Research. News*, 17:18-19, 1992.

**Sperotto, R. A.; Boff, T.; Duarte, G.L.; Santos, L.S.; Grusak, M.A.; Fett, J.P.** Identification of putative target genes to manipulate Fe and Zn concentrations in rice grains. *Journal of Plant Physiology*. 167:1500-1506, 2010.

**Sperotto, R. A.; Vasconcelos, M. W.; Grusak, M.A.; Fett, J.P.** Effects of diferent Fe supplies on mineral partitioning and remobilization during the reproductive development of rice (*Oryza sativa* L.). *Rice Spring Open Journal*, 5: 1-11, 2012.

**Song, A.; Li, P.; Fan, F.; Li, Z.; Liang, Y.** The effect of silicon on photosynthesis and expression of its relevant genes in rice (*Oryza sativa* L.) under high-Zinc Stress. *Plos One*, 26: 1-21, 2014.

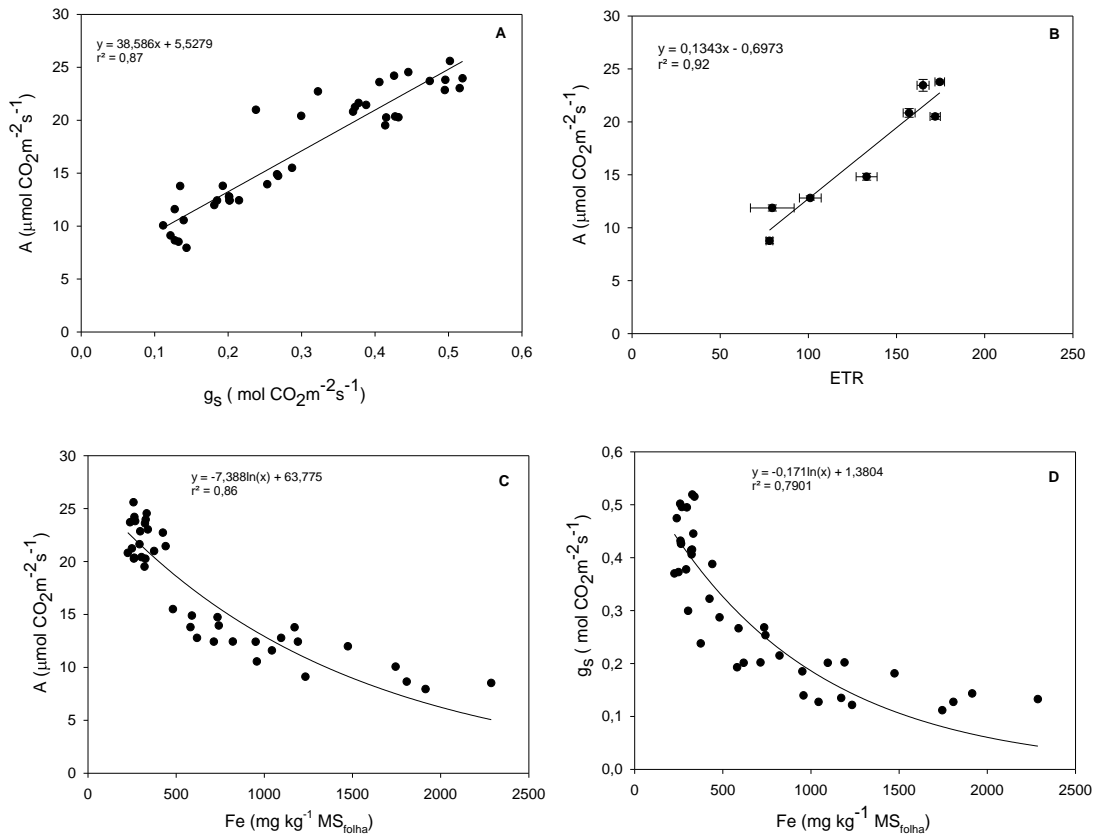
**Thomine, S.; Vert, G.** Iron transport in plants: better be safe than sorry. *Current Opinion in Plant Biology*, 16: 322-327, 2013.

**Vahl, L.C.** Toxidez de ferro em genótipos de arroz irrigado por alagamento. 173 f. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) – Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 1991.

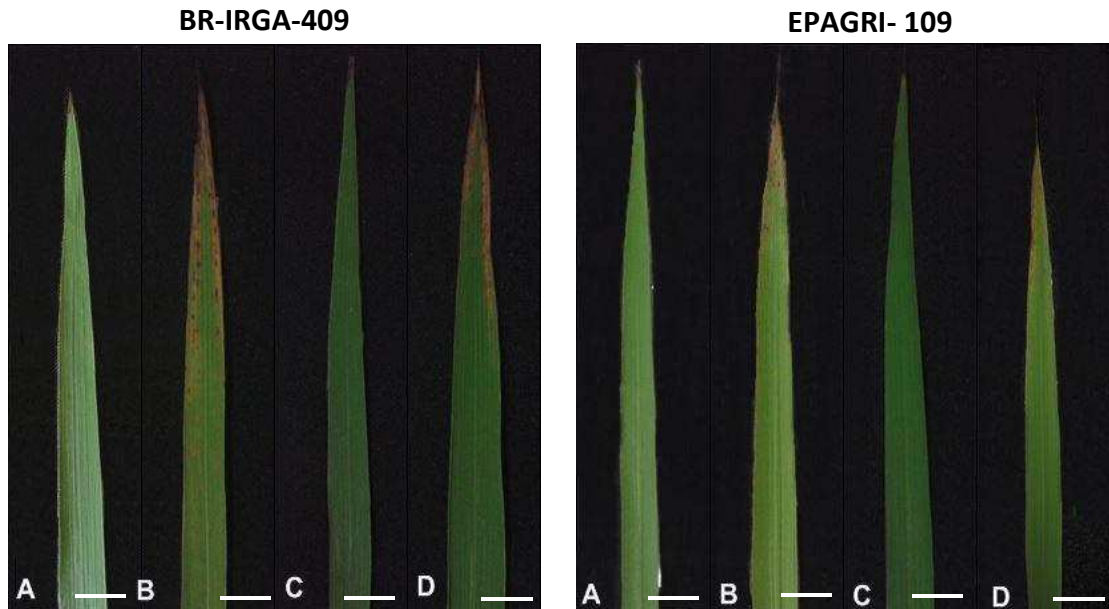
**Vaculík, M. Lux; A.; M. Luxová.; Tanimoto E.; Lichtscheidl I.** Silicon mitigates cadmium inhibitory effects in young maize plants. *Environmental and Experimental Botany*, 67:52–58, 2009.

**Von Caemmerer, S.; Farquhar, G.D.** Some relationships between the biochemistry od photosynthesis and the gas exchange of leaves. *Planta*, 153: 37 6-387, 1981.

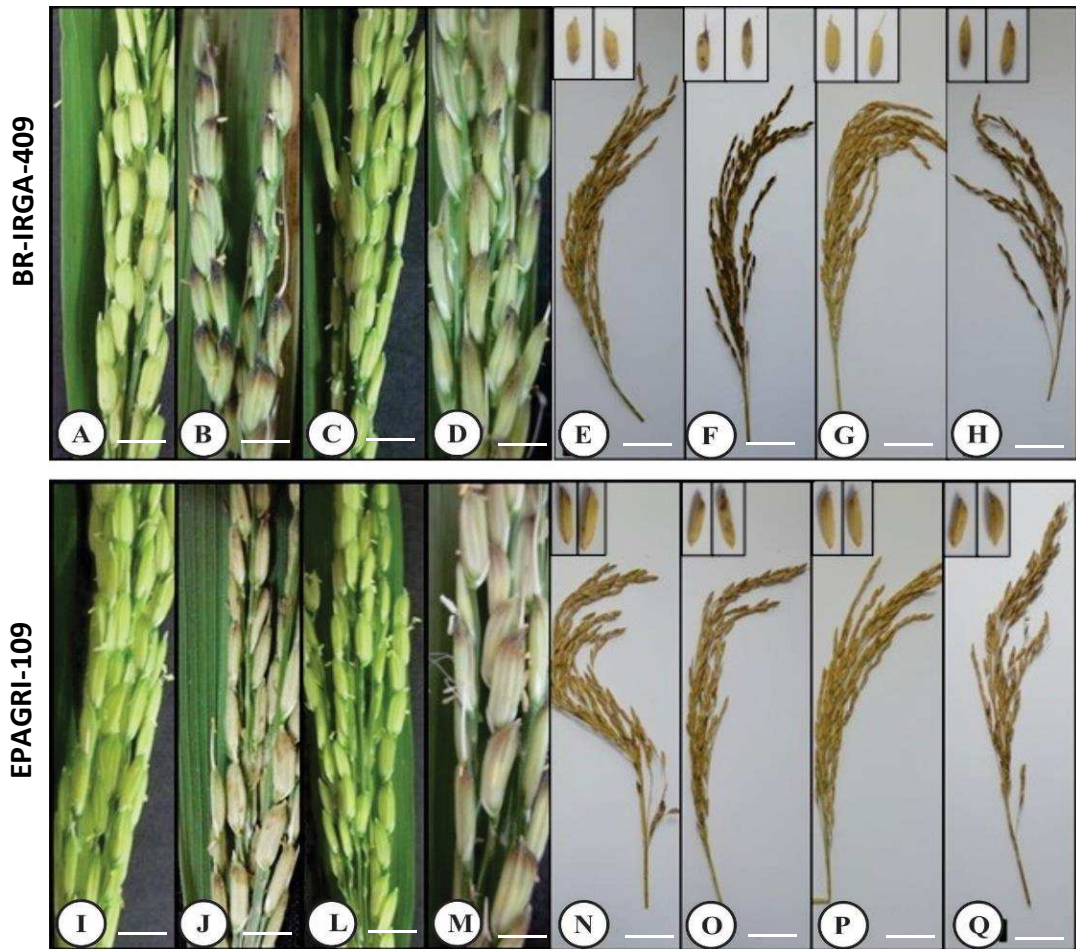
### ANEXO III - Dados suplementares



**Fig 1-** Relação entre o teor de Fe nas folhas, taxa de assimilação de  $\text{CO}_2$  (A) e a taxa de transporte de elétrons (ETR) para a condutância estomática ao  $\text{CO}_2$  ( $g_s$ ): (A) A e  $g_s$  (B) A e ETR (C) A e Fe (D)  $g_s$ ; e Fe.



**Fig 2.** Efeitos do silício, Si (0 ou 2  $\text{mmol L}^{-1}$ : -Si ou + Si, respectivamente) e ferro, Fe (25  $\mu\text{mol L}^{-1}$  ou 5  $\text{mmol L}^{-1}$ : -Fe e + Fe, respectivamente) sobre o ápice de folhas nos tratamentos -Si-Fe (A), -Si+Fe (B), +Si-Fe (C) e +Si+Fe (D) nas cultivares IRGA-409 e EPAGRI-109 (sensível e tolerante à toxidez por Fe), respectivamente, cultivadas em solução nutritiva. Barra= 20 mm



**Fig 3.** Efeitos do silício, Si (0 ou 2 mmol L<sup>-1</sup>: -Si ou + Si, respectivamente) e ferro, Fe (25 μmol L<sup>-1</sup> ou 5 mmol L<sup>-1</sup>: -Fe e + Fe, respectivamente) na formação da panícula (estádio R2) nos tratamentos -Si-Fe (A-I), -Si+Fe (B-J), +Si-Fe (C-L) e +Si+Fe (D-M); e enchimento de grãos (R6) nos tratamentos -Si-Fe (E-N), -Si+Fe (F-O), +Si-Fe (G-P) e +Si+Fe (H-Q) nas cultivares IRGA-409 e EPAGRI-109 (sensível e tolerante à toxidez por Fe), respectivamente, cultivadas em solução

## CONCLUSÃO GERAL

A fertilização com Si mitiga os impactos da toxidez por Fe em arroz, inicialmente, por reduzir o teor de Fe em folhas e raiz, devido aos decréscimos na expressão dos genes que codificam para os transportadores de Fe (IRT1 e IRT2), e retenção na parede celular da faixa esclerenquimática e endodérmica da raiz, que atuaram, assim, como barreiras apoplásticas na absorção e translocação de Fe para a parte aérea. Além disso, a julgar-se pela redução da placa de Fe, a faixa esclerenquimática também atuaria na redução da perda radial de oxigênio. Nas folhas, as células parenquimáticas do xilema funcionaram como um filtro na redução da distribuição de Fe no mesofilo que, associada ao armazenamento de Fe em ferritinas, contribuiu para o melhor desempenho fotossintético. Neste sentido, nas plantas +Si+Fe, de ambas as cultivares, os maiores valores de  $A$  foram associados a aumentos correspondentes de  $g_s$  e  $g_m$ , sendo essas respostas, indiretamente, correlacionadas aos menores teores de Fe nas folhas. Por outro lado, o excesso de Fe e/ou a fertilização com Si afetaram minimamente os parâmetros fotoquímicos e bioquímicos da fotossíntese, bem como as enzimas do metabolismo central do carbono, sugerindo notável homeostase metabólica e reforçando a importância de aspectos difusionais em relação aos bioquímicos no controle de  $A$ , em condições de toxidez por Fe.

No estágio reprodutivo, o excesso de Fe promoveu redução no crescimento e produtividade, além de ter induzido a toxidez indireta ao diminuir os teores de alguns nutrientes nas folhas (e.g. Ca, Mg, Cu, Mn). Por outro lado, a fertilização com Si reverteu parcialmente esses efeitos. Ademais, em ambas as cultivares, a fertilização com Si favoreceu ao aumento de  $A$  acoplado a um incremento de  $g_s$  e de ETR na folha-bandeira, contribuindo para sustentar o maior número de grãos por panícula e por plantas, refletido na maior porcentagem de grãos cheios, e conseqüentemente maior índice de colheita, mesmo em condição de excesso de Fe. A partir desses resultados, é possível sugerir que o Si tenha reduzido o impacto negativo do Fe sobre a esterilidade das espiguetas, dado possível papel do Si na fertilidade das panículas, o que favoreceu a maior produtividade e fotossíntese. Contudo, ainda são necessários estudos que coadunem todas as informações a fim de, em termos práticos, demonstrar que o manejo feito via fertilização silicatada pode de fato mitigar a toxidez por Fe em condições de campo.

Por fim, registre-se que este é o primeiro estudo que descreveu o mecanismo do Si na redução do teor de Fe em tecidos foliares por meio de mecanismos anatômicos (e.g. retenção de Fe na parede celular) e como estes ao reduzir o teor de Fe nos tecidos foliares são relacionados aspectos fotossintéticos e de produtividade.