

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal



Dissertação

**Respostas morfofisiológicas de *Ipomoea batatas* L. em
função da concentração de ferro**

Janete Mariza Adamski

Pelotas, 2011

Janete Mariza Adamski

**Respostas morfofisiológicas de *Ipomoea batatas* L. em
função da concentração de ferro**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Dr. José Antonio Peters

Co-orientador: Dr. Marcos Antonio Bacarin

Dr^a. Eugenia Jacira Bolacel Braga

Pelotas, 2011

Dados de catalogação na fonte:
(Marlene Cravo Castillo – CRB-10/744)

A211r Adamski, Janete Mariza

Respostas morfofisiológicas de *Ipomoea batatas* L. em função da concentração de ferro / Janete Mariza Adamski ; orientador José Antonio Peters; co-orientadores Marcos Antonio Bacarin e Eugênia Jacira Bolacel Braga. Pelotas,2011.-62f. : il.- Dissertação (Mestrado) –Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal. Instituto de Biologia. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2011.

1. Teste-JIP 2. EDTA-férrico 3. Estresse 4. Estômatos I. Peters, José Antonio (orientador) II .Título.

CDD 633.491

Banca Examinadora:

Prof. Dr. José Antonio Peters

Prof^ª. Dra. Diolina Moura Silva

Prof. Dr. Antonio Costa de Oliveira

A Carlos Roberto de Menezes Peixoto
Dedico e ofereço

AGRADECIMENTOS

Ao Professor José Antonio Peters, pela sua orientação, por seus ensinamentos e por sua amizade;

Ao professor Marcos Antonio Bacarin e a professora Eugênia Jacira Bolacel Braga, pela preciosa ajuda, paciência e atenção;

Aos Drs. Sidnei Deuner e a Juliana Aparecida Fernando pelos ensinamentos e contribuições ao longo do curso.

Aos amigos do Programa de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal (PPGFV) pela convivência e amizade, em especial a Alírcia Kleinowski, Camila Pinho de Souza, Marília Mércia, Anelise Perboni e Emanuela Martinazzo; Também aos meus queridos amigos e colegas da UNIJUÍ e UFPel, Daniela de Conti e Anderson Augusto Schock;

Aos bolsistas de iniciação científica Rodrigo Danielowski e Daniel Serpa pelo auxílio na condução dos experimentos;

Aos professores e funcionários do PPGFV pelos ensinamentos e apoio recebido;

Ao Ms. Luis Antônio Suita de Castro (EMBRAPA – Clima Temperado) e ao Prof. Dr. Ledemar Valh (laboratório de solos/FAEM) pela contribuição no desenvolvimento dos trabalhos;

A Professora Elisabeth Berne e Tiago Gallina (laboratório de parasitologia/UFPel) pela ajuda e disponibilização dos equipamentos de análise de imagens;

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro durante o curso;

E por fim, a todos aqueles que de alguma maneira contribuíram para que este trabalho fosse concluído.

RESUMO

ADAMSKI, Janete Mariza. **Avaliações morfofisiológicas de *Ipomoea batatas* L. em função da concentração de ferro.** 2011. 62f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

O ferro é um elemento essencial para o crescimento e desenvolvimento das plantas, estando envolvido em processos metabólicos essenciais, como fotossíntese e respiração. Entretanto, a homeostase desse metal é fundamental, pois tanto o excesso quanto a deficiência são prejudiciais. Um dos sintomas característico da deficiência é a clorose, causada pelo decréscimo na biossíntese da clorofila. Por outro lado, o ferro quando livre e em excesso pode gerar estresse oxidativo. Buscar entender os efeitos de diferentes concentrações de ferro, em nível morfológico, fisiológico ou bioquímico, é indispensável para um melhor entendimento da homeostase desse micronutriente nas plantas. No presente trabalho, plantas de batata-doce foram submetidas, sob sistema de hidroponia, a diferentes concentrações de EDTA-férrico em solução nutritiva: 0,45; 0,9; 4,5 e 9,0 mmol dm⁻³. Foram avaliadas características fotossintéticas e de crescimento, absorção de nutrientes, atividade de enzimas antioxidantes, densidade e tamanhos dos estômatos, ultra-estrutura de células radiciais e de células da folha e histoquímica do ferro nos tecidos foliares. A toxidez por excesso de ferro (9,0 mmol dm⁻³) levou ao surgimento de manchas marrons nas folhas, muitas vezes formando necroses, com reduções significativas no crescimento. Nestas plantas, a atividade da superóxido dismutase e ascorbato peroxidase aumentou. Também, a absorção dos demais micronutrientes foi afetada, principalmente do Mn. O teor de ferro na parte aérea aumentou significativamente, sendo visualizado pelo teste histoquímico. As reações luminosas da fotossíntese não foram comprometidas, porém houve queda na densidade estomática e na taxa assimilatória líquida. A ultra-estrutura das células radiciais revela o comprometimento das mitocôndrias nos tratamentos com altas concentrações de ferro. Porém, nestas plantas, a ultra-estrutura dos cloroplastos não é afetada.

Palavras-chave: teste JIP, EDTA-férrico, estresse, estômatos.

ABSTRACT

ADAMSKI, Janete Mariza. **Morphophysiological evaluations of *Ipomoea batatas* L. as a function of the iron concentration.** 2011. 62f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Iron is an essential element for growth and development of plants and is involved in essential metabolic processes such as photosynthesis and respiration. However, homeostasis of this metal is essential, both excess and deficiency are harmful. One of the characteristic symptoms of deficiency is chlorosis, caused by the decrease in chlorophyll biosynthesis. On the other hand, the free iron in excess can cause oxidative stress. Study of the effects of different concentrations of iron in morphological, physiological or biochemical parameters are essential to a better understanding of this nutrient homeostasis in plants. In the present work, plants of sweet potato were submitted under hydroponics system, to different concentrations of ferric-EDTA in nutrient solution: 0.45; 0.9; 4.5 and 9.0 mmol dm⁻³. Photosynthetic and growth characteristics, nutrient absorption, antioxidant enzymes, stomatal density and diameter, ultra structure of root and leaves cells and histochemical iron in the leaves were evaluated. The toxicity of iron in excess (9.0 mmol dm⁻³) led to the appearance of brown spots on leaves, often forming necroses, with significant reductions in growth. In these plants, the activity of superoxide dismutase and ascorbate peroxidase increased. Also, the absorption of other micronutrients was affected mainly of the manganese. The iron content in the shoot increased, also qualitatively confirmed by the histochemical test. The light reactions of photosynthesis were not affected, but there was a decrease in stomatal density and net assimilation rate. The ultra structure of root cells reveals the damage of mitochondria in treatments with high concentrations of iron. However, in these plants, the ultra structure of chloroplasts is not affected.

Keywords: JIP-test, Fe-EDTA, stress, stomata.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	8
CAPÍTULO 1 - Características fotossintéticas em batata-doce submetida a diferentes concentrações de ferro	14
1. Introdução.....	15
2. Material e métodos.....	17
2.1. Condições de crescimento	17
2.2. Avaliação da cinética de emissão da fluorescência transiente ou polifásica (OJIP).....	18
2.3. Trocas gasosas	18
2.4. Conteúdo de clorofila.....	19
2.5. Análise estatística	19
3. Resultados.....	19
3.1. Análise da cinética da fluorescência transiente (OJIP)	19
3.2. Análise da fluorescência transiente da clorofila a (OJIP).....	23
3.3. Índice de clorofila, fotossíntese líquida, condutância estomática e taxa de transpiração	25
4. Discussão	26
5. Conclusão.....	30
CAPÍTULO 2 - Alterações fisiológicas, bioquímicas e anatômicas em plantas de batata-doce submetidas a diferentes concentrações de ferro	31
1. Introdução.....	32
2. Material e métodos.....	34
3. Resultados e discussão	37
5. Conclusão.....	50
CONSIDERAÇÕES FINAIS	51
REFERÊNCIAS.....	53

INTRODUÇÃO

O ferro, um micronutriente encontrado naturalmente na crosta terrestre, é considerado essencial para o crescimento e desenvolvimentos das plantas. A forma absorvida pelas raízes da maioria das plantas é Fe^{2+} (forma mais solúvel), entretanto o ferro também pode ser absorvido como Fe^{3+} -quelato (SCHMIDT, 2003). A translocação do ferro para a parte aérea ocorre via xilema, através da corrente transpiratória e, em sua maior parte, complexado com o citrato (BRIAT; CURIE; GAYMARD, 2007). Em arroz, o transporte via xilema do complexo Fe-citrato é realizado através da proteína FRDL1, recentemente identificada (YOKOSHO et al., 2008). No floema, o ferro possui baixa mobilidade, no entanto, o ácido nicotinâmico (NA) é sugerido como seu transportador (TAKAHASHI et al., 2003). Também, foi purificada e identificada no exsudato do floema de *Ricinus communis* uma proteína transportadora de ferro de 2,4 kDa que se liga especificamente a Fe^{3+} e não a Fe^{2+} , denominada ITP (*Iron transport protein*), capaz de ligar-se igualmente a outros metais como Cu^{2+} , Zn^{2+} e Mn^{2+} (KRÜEGER et al., 2002).

No interior das células o ferro é armazenado nos cloroplastos, mitocôndrias e no vacúolo (JEONG; GUERINOT, 2009). A compreensão dos mecanismos celulares que envolvem a captura do ferro pelas raízes está relativamente bem elucidada. No entanto, estudos ou informações a respeito dos mecanismos envolvidos na mobilização do ferro para compartimentos celulares como mitocôndrias, cloroplastos e vacúolos, estão apenas começando. De acordo com Jeong e Connolly (2009) a enzima quelato ferrico redutase vem sendo ligada à assimilação do ferro pelas células das folhas, assim como por cloroplastos e mitocôndrias de dicotiledôneas e de algumas monocotiledôneas. Em relação ao transporte para o vacúolo, foi identificado em *Arabidopsis* o transportador VIT1 (*Vacular Iron Transport 1*) (KIM et al., 2006). Já a remobilização do ferro armazenado no vacúolo para o metabolismo vegetal, requer a participação de transportadores identificados como NRAMP3 e NRAMP4 (BRIAT; CURIE; GAYMARD, 2007).

No metabolismo vegetal, o ferro está envolvido na fotossíntese, respiração mitocondrial, assimilação do nitrogênio (JEONG; CONNOLLY, 2009), biossíntese hormonal (etileno, ácido giberélico e ácido jasmônico), produção e seqüestro de espécies reativas de oxigênio e proteção contra patógenos (HANSCH; MENDEL, 2009). Em relação ao ferro intracelular, aproximadamente 80% deste metal encontra-se nas células fotossintetizantes, pois é essencial na biossíntese da molécula Heme dos citocromos e da molécula de clorofila (BRIAT; CURIE; GAYMARD, 2007), no transporte de elétrons e na construção dos agregados de Fe-S (JEONG; GUERINOT, 2009). No complexo fotossintético das plantas superiores, dois ou três átomos de ferro são constituintes de moléculas relacionadas diretamente ao fotossistema II (FSII), 12 átomos no fotossistema I (FSI), cinco no complexo citocromo b_6/f e dois na molécula de ferredoxina (VAROTTO et al, 2002). Também, várias enzimas envolvidas no metabolismo do nitrogênio e do enxofre, como redutase do nitrato, redutase do nitrito, redutase do sulfito e nitrogenase, utilizam grupos prostéticos contendo ferro (HÄNSCH; MENDEL, 2009).

A homeostase desse metal é fundamental para o crescimento e desenvolvimento dos vegetais, pois tanto o excesso quanto a deficiência são prejudiciais. Uma das causas principais da deficiência é a presença de carbonato no solo, onde o pH é elevado, deixando o ferro indisponível para absorção pelas raízes. Esta indisponibilidade acaba afetando o metabolismo bioquímico e a fisiologia das plantas (BERTAMINI, MUTHUCHELIAN, NEDUNCHEZHIAN, 2002; DONNINI et al., 2009; MAHMOUDI et al., 2009). Um dos sintomas característicos da deficiência é a clorose, causada pelo decréscimo na biossíntese da clorofila, o que provoca uma redução na fotossíntese líquida e na taxa de fixação de CO_2 (SHARMA, 2007; MAHMOUDI et al., 2009).

Atualmente, dois mecanismos relacionados à absorção do ferro pelas raízes são bem conhecidos, intensificados conforme a deficiência: o primeiro, característico das dicotiledôneas e monocotiledôneas não gramíneas (*Estratégia I*), prótons são expelidos por uma H^+ ATPase localizada na epiderme da raiz, acidificando a rizosfera, pois quanto menor o pH, maior a solubilidade e, conseqüentemente, maior a disponibilidade de ferro para as raízes (SCHMIDT, 2003; JEONG, CONNOLLY, 2009). Os Fe^{3+} -quelatos são então reduzidos por uma Quelato ferrico redutase e transportados através da membrana plasmática da raiz por transportadores de íon ferroso (SCHMIDT, 2003). No segundo, utilizado pelas gramíneas (*Estratégia II*),

envolve a extrusão de sideróforos pelas raízes. Estes formam complexos com íons férricos (Fe-sideróforo) e são transportados através de transportador específico localizado na membrana plasmática da epiderme da raiz codificado pelo gene *YS1* (SCHMIDT, 2003; JEONG, CONNOLLY, 2009).

Em plantas de *Populus glauca*, a deficiência de ferro parece ser um fator chave na inibição da fotossíntese induzida pelo cádmio (SOLTI, et al., 2008). Estudos de saturação de luz em milho sob deficiência de ferro mostraram que as plantas ficam mais suscetíveis aos danos causados pela fotoinibição, com decréscimo na taxa de fixação de CO₂, no conteúdo de clorofila e na capacidade de transporte de elétrons (SHARMA, 2007). Assim, a deficiência do ferro afeta o processo fotossintético e, conseqüentemente, o desenvolvimento dos vegetais.

Por outro lado, estudos têm demonstrado que as mesmas propriedades físicas que permitem ao ferro atuar como um eficiente cofator e catalisador nas reações redox na célula, também permitem sua atuação como potente elemento tóxico (OLALEYE et al., 2009). Esta condição ocorre pelo aumento da concentração de Fe²⁺ na solução do solo (CRESTANI et al., 2009). O excesso de ferro leva a potencialização de estresse oxidativo, com aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), como o superóxido (O₂⁻), radicais hidroxila ([•]OH), oxigênio singlete (O₂¹) e o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (ROBELLO; GALATRO, 2007). As EROs podem ser altamente destrutivas, pois lesionam seriamente vários componentes celulares, dentre eles, lipídeos, proteínas, carboidratos e ácidos nucléicos (SMIRNOFF, 1993), levando a uma diversidade de alterações morfológicas, bioquímicas e fisiológicas (BECANA et al., 1998; FANG et al., 2001).

Os efeitos do excesso do ferro podem ser diretos, quando há absorção e acúmulo excessivo nos tecidos das plantas (SILVEIRA et al, 2007) ou indireto, quando o ferro precipita-se sobre a superfície das raízes, formando uma camada denominada placa de ferro (LIU; ZHANG; ZHANG, 2007). Esta placa de ferro pode alterar a absorção de nutrientes essenciais pelas raízes, resultando em uma deficiência nutricional múltipla (ZHANG; ZHANG; MAO, 1999). Os sintomas dessa deficiência incluem atrofia da planta, redução das brotações, folhas alaranjadas e raízes cobertas por uma camada vermelha de ferro oxidado (VALH, 1991).

Todavia, algumas plantas conseguem adaptar-se às condições impostas para sua sobrevivência adquirindo mecanismos de tolerância. No caso de excesso de ferro, uma das formas de limitar os danos causados é interromper a oxidação

descontrolada através de enzimas antioxidantes. A primeira enzima de defesa contra danos causados pelas EROs é a superóxido dismutase (SOD), onde o Fe, assim como o Mn, Cu e Zn, é o seu cofator metálico. A SOD é encontrada em vários compartimentos celulares e cataliza o desproporcionamento de dois radicais O_2^- para H_2O_2 e O_2 (SINHA, 2006). Além da SOD, as catalases (CAT) e as peroxidases têm recebido maior atenção no que concerne a esse mecanismo de proteção, pois removem o peróxido formado, que também é tóxico para a célula (APEL; HIRT, 2004; COSTA et al., 2005). Essas enzimas podem estar localizadas tanto no citosol como nas mitocôndrias, nos peroxissomas e nos cloroplastos (Del RIO et al., 1998). Em estacas de *Nicotiana plumbaginifolia* cultivadas em sistema de hidroponia, o excesso de ferro levou a quedas de 40% na atividade fotossintética, redução de 30% no conteúdo celular de ascorbato e glutathiona (dois agentes antioxidantes) e uma maior atividade da ascorbato peroxidase (APX) (KAMPFENKEL; VAN; INZÉ, 1995).

Outra forma de evitar a toxicidade pelo excesso de ferro é armazená-lo na proteína ferritina (CONNOLLY; GUERINOT, 2002), que armazena até 4500 átomos deste elemento (HINTZE; THEIL, 2006). A fitoferritina também tem sido associada ao controle do estresse oxidativo em *Arabidopsis* (RAVET et al, 2009).

Além disso, estudos com espécies vegetais têm evidenciado plasticidades fisiológicas e anatômicas em função das condições ambientais de cultivo (ADAMSKI; COELHO 2008). Alterações no comportamento estomático são características variáveis em plantas em função do ambiente e do estresse que estão submetidas (MELO et al. 2007, CASTRO et al., 2005).

Quando plantas são submetidas a condições estressantes de acúmulo de ferro, também existem respostas diferentes para superar esse tipo de toxidez de acordo com a espécie (FAROOQUI et al., 1995; KUKI et al., 2008; NEVES et al., 2009). Quando as espécies *Schinus terebinthifolius* e *Sophora tomentosa* foram expostas à deposição de partículas de ferro e a névoa ácida, ambas as espécies responderam diferentemente a esses tipos de poluentes: em *S. tomentosa*, houve diminuição na fotossíntese, aumento no teor de ferro, assim como, na atividade de enzimas anti-oxidantes. Por outro lado, *S. terebinthifolius* apresentou aumento no conteúdo de clorofila, máxima eficiência quântica do fotossistema II e na taxa de transporte de elétrons; já o teor de ferro ficou inalterado, e não houve estresse oxidativo (KUKI et al., 2008). Analisando a taxa fotossintética, a condutância estomática e o acúmulo de metais nas espécies *Cineraria maritima* e *Centaurea*

moschata quando submetidas a tratamentos com Fe, Mn e Cu, observou-se que ambas as espécies apresentaram acúmulo desses metais em sua biomassa. A taxa fotossintética e o conteúdo de clorofila foram menores em *C. marítima*, enquanto que em *C. moschata*, a condutância estomática foi mais afetada (FAROOQUI et al., 1995).

Considerando que o aparelho fotossintético é muito sensível ao estresse ambiental, o uso da fluorescência da clorofila *a* tem sido uma técnica importante para avaliar a eficiência fotossintética em plantas, mais especificamente do comportamento do FSII (KRAUSE; WEIS, 1991). Esta técnica tem permitido um aumento do conhecimento dos processos fotoquímicos e não fotoquímicos que ocorrem na membrana dos tilacóides dos cloroplastos (ROHÁČEK, 2002), além de possibilitar o estudo de características relacionadas à capacidade de absorção e transferência de energia luminosa na cadeia de transporte de elétrons, sendo também possível estudos das mudanças conformacionais dos tilacóides (KRAUSE; WEIS, 1991).

Assim, tanto a deficiência quanto o excesso de ferro pode causar disfunções nutricionais e afetar a fisiologia das plantas. Buscar entender os efeitos de diferentes concentrações de ferro, tanto em nível morfológico, fisiológico ou bioquímico, é indispensável para um melhor entendimento da homeostase desse micronutriente nas plantas. Esse conhecimento contribuirá de maneira significativa com os programas de melhoramento genético ou para o desenvolvimento de variedades ou cultivares resistentes ao excesso ou a falta deste nutriente no solo.

A presente dissertação teve como objetivo estudar os efeitos de diferentes concentrações deste metal nos processos relacionados à fotossíntese, atividades de enzimas antioxidantes, densidade e tamanho dos estômatos, absorção de nutrientes, ultra-estrutura de células radiciais e de células do mesofilo, bem como, seu acúmulo em folhas de *Ipomoea batatas* L.

Espécie estudada

A batata-doce (*Ipomoea batatas* L.) é uma planta dicotiledônea, pertencente à família Convolvulaceae que agrupa, aproximadamente, 50 gêneros e mais de 1.000 espécies e, somente a batata-doce, tem expressão econômica (EDMOND; AMMERMAN, 1971). É uma planta herbácea, normalmente com hábito de

crescimento rasteiro (RITSCHER, 1999), com ramificações de tamanho, cor e pilosidade variáveis; folhas largas com tamanhos e recortes diferentes, flores biespóricas de fecundação cruzada e fruto do tipo cápsula deiscente com até quatro sementes (EDMOND; AMMERMAN, 1971).

No Brasil, a batata-doce é cultivada nas regiões sul e nordeste (SILVA; LOPES; MAGALHÃES, 2002), principalmente pelos pequenos agricultores, como cultura de subsistência. Constitui um alimento altamente energético, rico em carboidratos, açúcares, sais minerais e vitaminas A, C e do Complexo B (MIRANDA et al., 1987). Também, apresenta potencial para a produção de etanol (SMITH; FRANK, 1984). É uma planta amplamente adaptada a diversas condições de solo em termos nutricionais e de pH (FOLQUER, 1978). De acordo com Miranda et al. (1987), o potencial de produção da batata-doce é alto por ser uma das plantas com grande capacidade de produzir energia por unidade de área e tempo (Kcal/ha/dia). Além disso, esta planta apresenta ótima propagação em sistemas de hidroponia e, pela grande capacidade de crescimento em curto período de tempo, facilita a realização de experimentos na área da nutrição e fisiologia vegetal.

CAPÍTULO 1

CARACTERÍSTICAS FOTOSSINTÉTICAS EM BATATA-DOCE SUBMETIDA A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE FERRO

Photosynthetic characteristics in sweet potato under different concentrations of iron

RESUMO - O ferro é um nutriente essencial para o crescimento e desenvolvimento dos vegetais, sendo 80% de sua concentração encontrada nas células fotossintetizantes, participando diretamente na fotossíntese. Com o objetivo de avaliar os efeitos da exposição a diferentes concentrações de ferro sobre características fotossintéticas, plantas de batata-doce (*Ipomoea batatas* L.) foram submetidas, sob sistema de hidroponia, utilizando solução de Hoagland, a qual continha diferentes concentrações de ferro (0,45; 0,9; 4,5 e 9,0 mM de EDTA-férrico). Após sete dias de exposição aos tratamentos foi medida a fluorescência transiente (OJIP), índice de clorofila e trocas gasosas. Verificou-se aumento das fluorescências inicial e máxima para o tratamento com 9,0 mM de Fe em relação ao tratamento com 0,9 mM (controle). Na análise da diferença da cinética de fluorescência identificou-se as bandas L e K para todos os tratamentos, sendo as mesmas com maior amplitude para os tratamentos com 4,5 e 9,0 mM de Fe. Os parâmetros do teste JIP que descrevem a absorção e eficiência de aproveitamento da energia luminosa foram intensificados no tratamento com 9,0 mM de Fe em comparação ao controle (0,9 mM), indicando uma melhor eficiência na captura, absorção e aproveitamento da energia luminosa quando as plantas foram submetidas à maior concentração de ferro. O índice de clorofila também foi maior para as plantas do tratamento com 9,0 mM de ferro, porém a fotossíntese líquida foi menor. Os resultados indicam que plantas de batata-doce, quando submetidas a altas concentrações de ferro, não apresentam sinais de toxidez que possam comprometer as reações luminosas da fotossíntese, mas apresentam uma queda na taxa assimilatória líquida.

Palavras-chave: *Ipomoea batatas*, teste JIP, EDTA-férrico.

ABSTRACT - Iron is an essential nutrient for plant growth and development. In plant tissues about 80% of it is found in photosynthetic cells, participating directly in photosynthesis. This study was done to determine the effect of different iron concentrations on the photosynthetic characteristics of sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) plants. The transient fluorescence (OJIP), chlorophyll index and gas exchange were measured in plants grown for seven days in Hoagland solution, containing iron concentration of 0.45, 0.9, 4.5 and 9.0 mM as Fe-EDTA. The initial and the maximum fluorescence increased in plants receiving to 9.0 mM Fe. In the

analysis of the fluorescence kinetic difference, L and K bands appeared in all treatments, but the amplitude was higher in plants receiving 4.5 or 9.0 mM Fe. In plants growing in 9.0 mM Fe, the parameters of JIP Test indicated better efficiency in the capture, absorption and use of the light energy, and although the chlorophyll index was higher, the net photosynthesis was lower. The overall data showed that sweet-potato plants subjected to high iron concentrations may not show the toxicity symptoms that can compromise the light reactions of photosynthesis, with declining net assimilation rate.

Keywords: *Ipomoea batatas*, JIP-test, ferric-EDTA.

1. INTRODUÇÃO

O ferro, micronutriente essencial para o crescimento e desenvolvimento dos vegetais, apresenta, entre outras funções, envolvimento direto na fotossíntese, respiração, fixação do nitrogênio, formação de hormônios e manutenção dos cloroplastos (HÄNSCH; MENDEL, 2009). Na planta, aproximadamente 80% deste nutriente encontra-se nas células fotossintetizantes (HÄNSCH; MENDEL, 2009), sendo fundamental na biossíntese da molécula Heme dos citocromos e das moléculas de clorofila (BRIAT; CURIE; GAYMARD, 2007), no transporte de elétrons e na construção dos agregados de Fe-S (HÄNSCH; MENDEL, 2009). No aparato fotossintético das plantas superiores, dois ou três átomos de ferro são constituintes de moléculas relacionadas diretamente ao fotossistema II (FSII), 12 átomos no fotossistema I (FSI), cinco no complexo citocromo b_6f e dois na molécula ferredoxina (VAROTTO et al, 2002). Desta forma, observa-se que o ferro apresenta envolvimento direto na atividade fotossintética das plantas e conseqüente produtividade das mesmas (BRIAT; CURIE; GAYMARD, 2007).

As concentrações normais de ferro em plantas estão entre 30-300 $\mu\text{g g}^{-1}$ de massa seca, enquanto que as concentrações consideradas fitotóxicas estariam acima de 500 $\mu\text{g g}^{-1}$ (PUGH; DICK; FREDEEN, 2002). Porém, o valor considerado crítico depende da espécie, do estado fisiológico e das condições de crescimento (DOBERMANN; FAIRHURST, 2000).

Desse modo, para sustentar o crescimento e evitar a toxicidade do ferro intracelular, as plantas dependem da sua capacidade de armazená-lo e remobilizá-lo, alcançando assim, a homeostase (JEONG; GUERINOT, 2009). Contudo, condições ambientais adversas podem interferir nessa condição, tanto por excesso

quanto por deficiência deste elemento. Um dos sintomas característico da deficiência é a clorose foliar, causada pelo decréscimo na biossíntese da clorofila e carotenóides (ABADÍA; MORALES; ABADÍA, 1999), redução na taxa assimilatória líquida de CO₂ (SHARMA, 2007), desorganização dos complexos fotossintéticos (TIMPERIO et al., 2007), alteração na ultraestrutura das mitocôndrias e dos cloroplastos (BRIAT et al., 1995; GAYMARD, 2007), aumento na resistência estomática e diminuição na taxa transpiratória (NENOVA, 2009) com conseqüente declínio na produção de biomassa (YOUSFI et al., 2009). Por outro lado, o excesso de ferro pode levar ao surgimento de manchas marrons nas folhas, muitas vezes formando necroses, assim como o escurecimento e a formação de placas de ferro nas raízes, as quais podem interferir na absorção de nutrientes, principalmente do P (ZHANG; MAO; ZHANG, 1999), e outros íons, como arsênico e cádmio (LIU et al., 2005; LIU et al 2007). Também são observadas alterações na fotossíntese, inibição do crescimento, diminuição da concentração de clorofila (CHATTERJEE; GOPAL; DUBE, 2006) e potencialização do estresse oxidativo, com aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (ROBELLO; GALATRO, 2007).

Estudos de características fotossintéticas em batata doce sob condições de estresse por falta ou excesso de ferro são escassos. Contudo a utilização de ferramentas modernas tem possibilitado a compreensão do efeito de qualquer tipo de estresse sobre a fotossíntese.

O uso da fluorescência da clorofila *a* tem sido uma técnica importante para avaliar a eficiência fotossintética em plantas, mais especificamente do comportamento do FSII (KRAUSE; WEIS, 1991), principalmente sobre condições de estresse. Esta técnica tem permitido um aumento do conhecimento dos processos fotoquímicos e não fotoquímicos que ocorrem na membrana dos tilacóides dos cloroplastos (ROHÁCEK, 2002), além de possibilitar o estudo de características relacionadas à capacidade de absorção e transferência de energia luminosa na cadeia de transporte de elétrons, sendo também possível estudos das mudanças conformacionais dos tilacóides (KRAUSE; WEIS, 1991). Constitui um método rápido e não destrutivo capaz de detectar com segurança e confiabilidade efeitos de estresse e injúrias no processo fotossintético (YUSUF et al., 2010), constituindo importante avanço em estudos fisiológicos e em ecologia de plantas (KRAUSE; WEISS, 1991). A cinética de emissão da fluorescência constitui em um aumento polifásico ou transiente da fluorescência inicial até a máxima, a qual inclui os pontos

O, J, I e P. Esta análise permite a avaliação *in vivo* da vitalidade das plantas em termos de parâmetros biofísicos, quantificando a conservação da energia fotossintética (TSIMILLI-MICHAEL; STRASSER, 2008).

Estresses ambientais como altas temperaturas (STRASSER, 1997), hídrico (OUKARROUM; SCHANSKER; STRASSER, 2009), luz (LU; VONSHAK, 1999), salinidade (ZANANDREA et al., 2006), poluentes ambientais como trifluoracetato (SMIT et al., 2009) e metais pesados (APPENROTH et al., 2001) podem provocar mudanças na fluorescência transiente O-J-I-P da clorofila *a*. No entanto, existem poucas informações acerca dos efeitos de diferentes concentrações de ferro, principalmente em relação ao excesso, no fluxo energético do FSII e na cadeia de transporte de elétrons que dará origem ao ATP e ao NADPH₂.

O trabalho teve como objetivo avaliar os parâmetros da fluorescência transiente da clorofila *a*, as trocas gasosas e o índice de clorofila em plantas de batata-doce (*Ipomoea batatas* L.) submetidas a diferentes concentrações de ferro.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Condições de crescimento

Para o desenvolvimento deste experimento (outubro de 2009), foram utilizadas plantas de batata-doce, cv. ILS19, obtidas de ramos apicais, com comprimento médio de 10 cm de plantas já estabelecidas em casa de vegetação, previamente enraizadas em esponja hidropônica com água destilada Milli-Q. As plantas foram transplantadas para um sistema de hidroponia intermitente e irrigadas com solução nutritiva de Hoagland & Arnon (1938), contendo diferentes concentrações de ferro: 0,45; 0,9; 4,5 e 9,0 mM, na forma de EDTA-ferrico, o tratamento com 0,9 mM de Fe foi considerado como controle, em virtude de ser a concentração recomendada. O pH das soluções foi ajustado para 5,0, sendo as mesmas renovadas a cada três dias. As plantas permaneceram nestas condições por sete dias, ao final dos quais foram realizadas as determinações de fluorescência e trocas gasosas.

2.2. Avaliação da cinética de emissão da fluorescência transiente ou polifásica (OJIP)

Após sete dias de aplicação dos tratamentos, folhas novas e completamente expandidas foram usadas para as medidas da fluorescência da clorofila usando um fluorômetro portátil (HandyPEA, Hanstech, King's Lynn, Norfolk, UK). Para cada tratamento (concentração de ferro) as fluorescências transientes da clorofila de 10 folhas individuais foram medidas. As folhas foram mantidas no escuro por 20 minutos antes da obtenção dos dados. A intensidade máxima da fonte de luz, proporcionando um pulso de irradiância saturante de $3000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de fótons, foi usada. A intensidade da fluorescência foi medida em 50, 100, 300 μs , 2 (F_J), 30 (F_I) ms e a F_M (fluorescência máxima). A partir das intensidades de fluorescência foram calculados os parâmetros estabelecidos pelo Teste JIP (STRASSER; STRASSER, 1995), sendo que a cuidadosa interpretação dos parâmetros medidos e calculados a partir deste teste fornece numerosas informações dos fluxos de energia através do FSII em diferentes níveis (STRASSER; SRIVASTAVA; TSIMILLI-MICHAEL, 2004).

2.3. Trocas gasosas

Após as medidas da fluorescência da clorofila, as mesmas folhas foram usadas para as medidas de trocas gasosas, utilizando-se um sistema portátil de fotossíntese LI-6400, equipado com câmera foliar LI-6400-40 e fluorômetro (Li-Cor Inc., Lincoln, NE, USA).

As determinações das trocas gasosas foram realizadas em um sistema aberto com densidade de fluxo de fótons fotossintética (PPFD) mantida a $1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, a concentração interna de CO_2 na câmara foi controlada com um misturador de CO_2 e fixada em $370 \mu\text{mol mol}^{-1}$, umidade relativa de 45-50%, e temperatura foliar em $27 \pm 2^\circ\text{C}$. Medidas foram feitas das 8:00 -10:00 h em dias de sol. Determinou-se a taxa fotossintética líquida em luz saturante (A_{sat} , $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), a taxa de transpiração (T_r , $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e condutância estomática (g_s , $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

2.4. Conteúdo de clorofila

O conteúdo de clorofila foi estimado por um medidor de clorofila portátil (CL-01, Hansatech, King's Lynn, Norfolk, UK) e os resultados foram expressos como "índice de clorofila" (CASSOL et al., 2008).

2.5. Análise estatística

Os dados foram submetidos ao teste one-way ANOVA usando Origin 8 (OriginLab Corporation, USA) (ORIGINLAB, 2008) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Foram usadas dez plantas por tratamento.

3. RESULTADOS

3.1. Análise da cinética da fluorescência transiente (OJIP)

A intensidade da fluorescência transiente da clorofila *a* (F_t) de folhas adaptadas ao escuro de batata-doce pode ser observada na Figura 1A (dados apresentados em escala logarítmica de tempo de 50 μ s a 1 s), na qual pode-se destacar um leve aumento na fluorescência inicial (F_0) e um incremento mais acentuado na fluorescência máxima (F_M), principalmente nas plantas submetidas ao tratamento com 9,0 mM de Fe. Por outro lado, ocorreu um decréscimo na fluorescência variável relativa quando as plantas foram submetidas a maior concentração de ferro (Figura 1B).

As curvas das diferenças da cinética de fluorescência transiente em relação ao tratamento controle, ($\Delta W_t = W_{t(\text{estresse})} - W_{t(\text{controle})}$), na faixa de 50 μ s a 1 s (Figura 1C) mostram um efeito da alta dose de ferro (9,0 mM), pelo aparecimento de bandas negativas nas fases OJ e JI.

Na Figura 1D, os dados de fluorescência foram normalizados entre os pontos O (50 μ s) e K (300 μ s) [$W_{OK} = (F_t - F_0)/(F_K - F_0)$], e apresentados como diferença cinética ($\Delta W_{OK} = W_{OK(\text{estresse})} - W_{OK(\text{controle})}$). Na Figura 1E pode-se visualizar o aparecimento da banda L (a cerca de 150 μ s) em todos os tratamentos com ferro em comparação com o tratamento controle (0,9 mM Fe). A banda L, descrita por Strasser e Stirbet (1998) é um indicador da conectividade energética (agrupamento)

das unidades do FS II, sendo maior quando a conectividade é menor (YUSUF et al., 2010). Elevada conectividade resulta em uma melhor utilização da energia de excitação e uma maior estabilidade do sistema (STRASSER; SRIVASTAVA; TSIMILLI-MICHAEL, 2004). Desse modo, as plantas de batata-doce submetidas ao tratamento com 9,0 mM de Fe apresentaram diminuição da conectividade energética (bandas L positivas), o mesmo acontecendo com as plantas dos demais tratamentos, porém em menor amplitude.

Os dados de fluorescência, da fluorescência transiente, foram normalizados entre os pontos O (50 μ s) e J (2ms), $W_{OJ} = (F_t - F_0) / (F_J - F_0)$ (Figura 1F) e representados com diferença cinética ($\Delta W_{OJ} = W_{OJ(\text{estresse})} - W_{OJ(\text{controle})}$) (Figura 1G), pela qual pode ser identificada a banda K (em torno de 300 μ s). A banda positiva K reflete a inativação do complexo de evolução de oxigênio e/ou um aumento do tamanho da antena do FSII (YUSUF et al., 2010), sendo que quanto maior a amplitude da banda-K, maior é a inativação do complexo de evolução de oxigênio. Todos os tratamentos proporcionaram a alteração na fase OK (Figura 1G), com o aparecimento de diferentes amplitudes da banda K. A maior amplitude foi nas plantas submetidas a 9,0 mM de Fe, e a menor com 0,45 mM de Fe.

Para avaliar a fase O-I, os valores de fluorescência da clorofila foram normalizados como $[W_{OI} = (F_t - F_0) / (F_I - F_0)]$, sendo que esta normalização permite, quando $W_{OI} < 1$, avaliar a sequência de eventos que ocorre a partir da captura do éxciton pelo FS II até a redução da plastoquinona. Nas Figuras 1H e 1I estão representados os dados de $W_{OI} = (F_t - F_0) / (F_I - F_0)$ na faixa de tempo de 50 μ s a 1s, e 30 a 300 ms, nas quais é possível identificar uma variação em W_{OI} entre os tratamentos, destacando valores mais acentuados para as plantas que receberam 9,0 mM Fe e inferiores para as que receberam 0,45 mM Fe.

Para avaliação da fase I-P, dois diferentes procedimentos foram utilizados: a) normalização das curvas $W_{OI} \geq 1$, que permite avaliar a sequência de eventos de transferência de elétrons da plastoquinona reduzida (plastoquinol - PQH₂) para os aceptores finais de elétrons do FS I; e b) dados normalizados como $[W_{IP} = (F_t - F_I) / (F_M - F_I)]$ em escala linear entre 30 e 180 ms. A fluorescência transiente variável normalizada entre os ponto I (30 ms) e P(t_{Fmax}) denominada $W_{IP} = (F_t - F_I) / (F_P - F_I)$, permite inferências sobre o comportamento dos fluxo de elétrons que atingem os aceptores do FS I. Na Figura 1J estão representados os dados de W_{IP} no intervalo de tempo de 30 a 180 ms, a qual apresenta um comportamento hiperbólico como

descrito por Michaelis-Menten (equação de primeira ordem), de forma que o inverso do tempo, para atingir $W_{IP}=0,5$, é uma estimativa da taxa global de redução dos aceptores de elétrons do FS I. No presente trabalho, a taxa global de redução dos aceptores finais de elétrons foi levemente maior (menor tempo para atingir $W_{IP}=0,5$) para os tratamentos com 0,45 e 9,0 mM de Fe. Para os tratamentos com as quantidades intermediárias de Fe, 0,90 e 4,50 mM, a taxa foi menor. Entretanto, as diferenças foram pequenas, de forma que não é possível afirmar que existe uma faixa de concentrações de Fe onde a taxa global de redução dos aceptores finais de elétrons é maior.

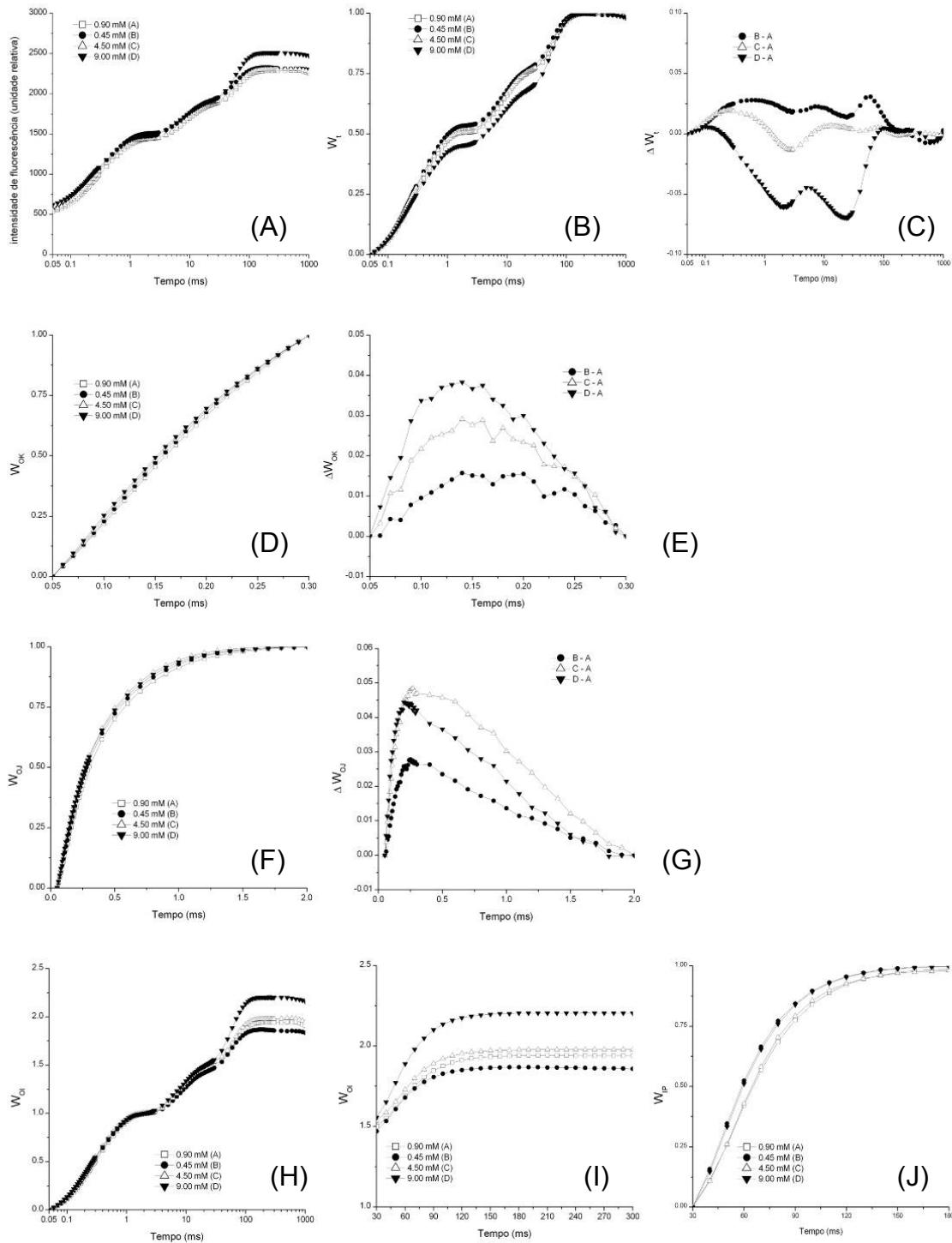


Figura 1 - Fluorescência transiente da clorofila *a* de folhas adaptadas ao escuro de batata-doce (*Ipomoea batatas* L.) em função da concentração de ferro. (A) Intensidade da fluorescência (F_t); (B) fluorescência variável relativa [$W_t = (F_t - F_0)/(F_M - F_0)$]; (C) diferença cinética de W_t [$\Delta W_t = (W_{t\text{estresse}} - W_{t\text{controle}})$]; (D) fluorescência variável entre os pontos O e K [$W_{OK} = (F_t - F_0)/(F_K - F_0)$]; (E) diferença cinética de W_{OK} [$\Delta W_{OK} = W_{OK}(\text{estresse}) - W_{OK}(\text{controle})$]; (F) fluorescência variável entre os pontos O e J [$W_{OJ} = (F_t - F_0)/(F_J - F_0)$]; (G) diferença cinética de W_{OJ} [$\Delta W_{OJ} = (W_{OJ}(\text{estresse}) - W_{OJ}(\text{controle}))$]; (H) fluorescência variável entre os pontos O e I [$W_{OI} = (F_t - F_0)/(F_I - F_0)$]; (I) W_{OI} no intervalo de tempo de 30 a 300 μ s; (J) fluorescência variável entre os pontos I e P [$W_{IP} = (F_t - F_I)/(F_P - F_I)$].

3.2. Análise da fluorescência transiente da clorofila a (OJIP)

Na Figura 2 são apresentados parâmetros biofísicos extraídos das curvas de fluorescência transiente da clorofila a e alguns parâmetros do Teste JIP (STRASSER; STRASSER, 1995), os quais estão representados na forma de gráfico de radar, sendo que todos os valores dos parâmetros de fluorescência foram normalizados para os valores medidos para as plantas do tratamento controle (0,9 mM de Fe). Os parâmetros do teste JIP correspondem a um detalhamento dos dados obtidos nas curvas cinéticas da fluorescência transiente.

Nas plantas submetidas a altos níveis de Fe (9,0 mM) pode-se identificar um leve aumento na fluorescência inicial (F_0) e da fluorescência máxima (F_M) na ordem de 15% e 10% respectivamente (Figura 2), bem como, um incremento no número total de quinonas reduzidas (N) em aproximadamente 14% em relação ao controle. Para o tratamento com nível reduzido de Fe (0,45 mM) identificou-se uma redução em S_m (medida da energia necessária para fechar todos os centros de reação do FS II), refletindo também na redução do número total de quinonas reduzidas (N) em relação ao controle.

Os parâmetros de fluxo específico por centro de reação revelam que a proporção de elétrons transferidos em relação ao número de centros de reação em tempo inicial (ET_0/RC) é maior para o tratamento com 9,0 mM de Fe, indicando maior eficiência da transferência eletrônica em presença de maior concentração de Fe. A proporção de elétrons recebidos pelos aceptores finais em relação ao número de centros de reação (RE_0/RC) apresenta aumento ainda maior para o tratamento com 9,0 mM de Fe.

Os parâmetros que descrevem os fluxos de energia fenomenológicos baseados na área de amostra excitada (CS), também revelam aumento para o tratamento com 9,0 mM de Fe, sendo eles: RC/CS_0 (densidade de centros de reação por CS), ABS/CS_0 (fluxo de absorção por CS), TR_0/CS_0 (fluxo de energia capturado por CS em $t = 0$) e ET_0/CS_0 (fluxo de transporte de elétron por CS em $t = 0$). Para os demais tratamentos, os valores aparecem próximos ao controle.

Para os parâmetros que descrevem o rendimento ou razão de fluxo, observa-se que para o rendimento quântico máximo fotoquímico em $t = 0$ ($\phi_{P0} = F_V/F_M$) não foram verificadas diferenças entre os tratamentos. Contudo, os parâmetros ϕ_{E0} (rendimento quântico de transporte de elétrons de Q_A^- para o

intersistema de aceptores de elétrons) e ϕ_{R0} (rendimento quântico para a redução do receptor final de elétrons do FSI por fóton absorvido) aumentaram nas plantas submetidas ao tratamento com 9,0 mM de Fe. O mesmo comportamento foi observado para os parâmetros relacionados com eficiência: a) ψ_0 (eficiência com que um éxciton capturado no centro de reação pode mover um elétron de Q_A^- para o intersistema de aceptores de elétrons); b) δR_0 (probabilidade de reduzir um receptor final de elétrons) e c) ρ_0 (eficiência com que um éxciton capturado no centro de reação pode mover um elétron dentro da cadeia de transporte de elétrons de Q_A^- para os aceptores finais de elétrons do FSI) que também aumentaram para o tratamento com 9,0 mM de Fe. Para os demais tratamentos não foram verificadas diferenças em comparação com o controle.

Em relação ao índice de performance fotossintético relativo à absorção (PI_{ABS}) (STRASSER et al., 1999, 2000, 2004) e índice de performance fotossintético total ($PI_{ABS,total}$), que mede a performance do fluxo de elétrons até os aceptores finais de elétrons do FSI (TSIMILLI-MICHAEL; STRASSER, 2008), observa-se queda neste índices nas plantas dos tratamentos com 0,45 mM e 4,5 mM de Fe, porém sob condições de alto ferro (9,0 mM), foi observado aumento nos dois índices de performance, com intensidade maior para $PI_{ABS,total}$.

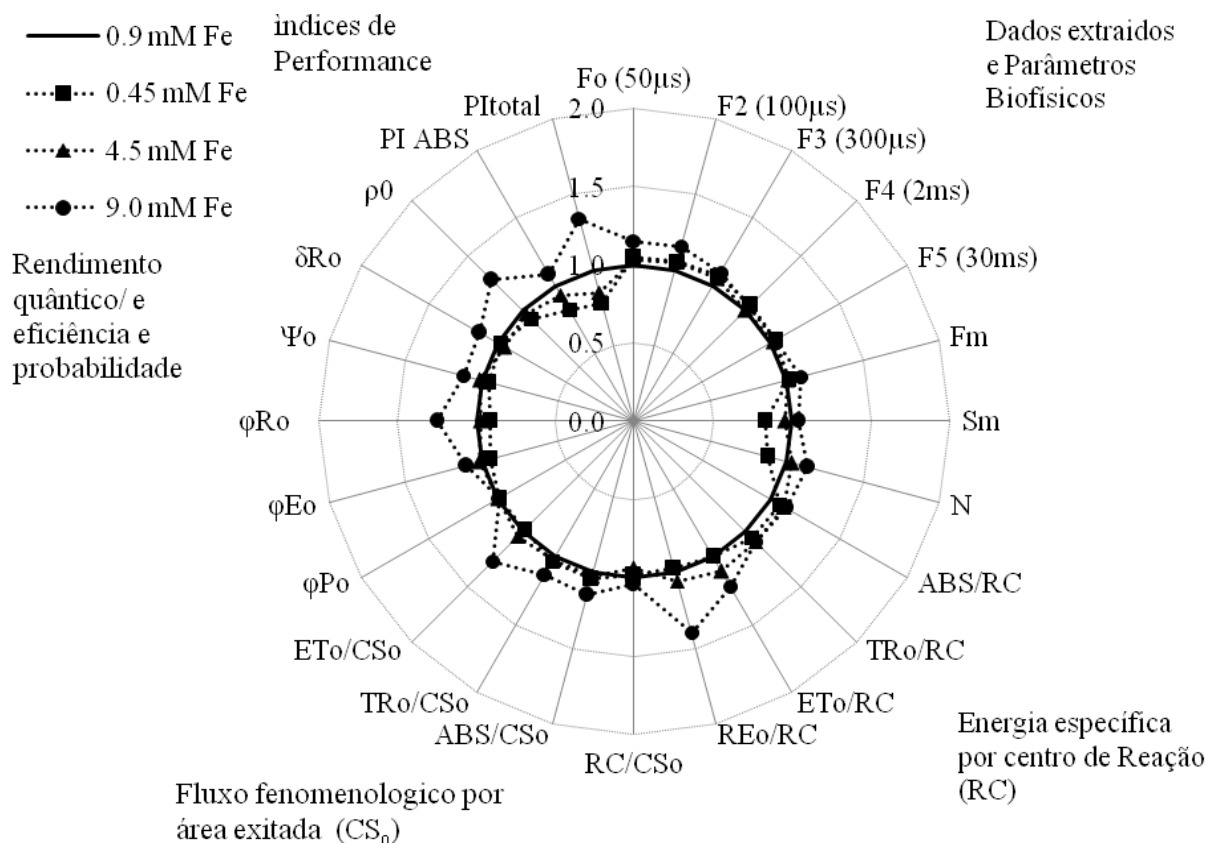


Figura 2 - Parâmetros de fluorescência da clorofila deduzidos de análise por Teste JIP da fluorescência transiente de plantas de batata-doce (*Ipomoea batatas* L.) submetidas a diferentes concentrações de ferro (0,45; 0,9; 4,5 e 9,0 mM).

3.3. Índice de clorofila, fotossíntese líquida, condutância estomática e taxa de transpiração

Os efeitos das diferentes concentrações de ferro sobre o índice de clorofila, fotossíntese líquida, condutância estomática e taxa de transpiração são apresentados na Tabela 01. O índice de clorofila diferiu significativamente apenas para as plantas do tratamento com 9,0 mM de Fe, sendo que neste tratamento foram obtidos os maiores valores. As plantas dos tratamentos com 4,5 e 9,0 mM de Fe apresentaram redução significativa na taxa fotossintética líquida quando comparado ao controle com 0,9 mM de Fe e com o tratamento com 0,45 mM de Fe. A condutância estomática não apresentou diferença significativa entre os diferentes tratamentos. Contudo, a transpiração mostrou um decréscimo para os tratamentos com 4,5 e 9,0 mM de Fe, os quais diferiram significativamente do tratamento com 0,9 e 0,45 mM de Fe.

Tabela 1. Índice de clorofila (unidade relativa), taxa de assimilação líquida ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), taxa de transpiração (T_r , $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e condutância estomática (g_s , $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) em saturação de PPFD (densidade de fluxo de fótons fotossintéticos) e CO_2 no ambiente ($370 \mu\text{mol mol}^{-1}$)

Concentração de Fe	Índice de clorofila	Taxa de assimilação líquida	Condutância estomática	Taxa de transpiração
mM	(u.r)	($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	($\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	($\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)
0,90	$4.82 \pm 0.68 \text{ b}^*$	$14.93 \pm 2.03 \text{ a}$	$0.49 \pm 0,07 \text{ ns}$	$10.36 \pm 1.25 \text{ a}$
0,45	$4.83 \pm 0.54 \text{ b}$	$13.74 \pm 1.25 \text{ a}$	0.50 ± 0.05	$10.09 \pm 0.71 \text{ ab}$
4,50	$5.61 \pm 0.68 \text{ b}$	$11.16 \pm 2.45 \text{ b}$	0.42 ± 0.10	$8.43 \pm 1.50 \text{ bc}$
9,00	$7.22 \pm 1.15 \text{ a}$	$11.96 \pm 1.02 \text{ b}$	0.41 ± 0.12	$7.95 \pm 1.75 \text{ c}$

*Valores seguidos por letras diferentes são significativamente diferentes pelo teste de Tukey ($P < 0.05$) ($n=5-10$, médias \pm erro padrão).

4. DISCUSSÃO

Toda mudança que ocorre no ambiente que provoque um estresse sobre as plantas, acaba provocando danos no processo fotossintético, dentre eles, a ocorrência de danos envolvendo os movimentos estomáticos, a coleta de luz e a etapa bioquímica de fixação do CO_2 (PELL; ECKART; GLICK, 1994). Alterações na atividade fotossintética induzida por metais pesados, incluindo pelo ferro, têm sido observadas em plantas e algas verdes (SOLTI et al, 2008; JIANRONG; QIRAN, 2009; NENOVA, 2009). No presente estudo, observou-se que plantas de batata-doce apresentaram queda na fotossíntese líquida nos tratamentos com 4,5 e 9,0 mM de Fe (níveis acima do recomendado), podendo ser sugerido que estes resultados estejam diretamente ligados com a baixa formação de poder redutor (NADPH_2 e ATP) e/ou com o comprometimento de algumas reações de carboxilação.

As plantas de todos os tratamentos com ferro apresentaram aumento da fluorescência transiente, revelando as fases OJIP típicas (STRASSER; STRASSER, 1995) e demonstrando que todas as amostras foram fotossinteticamente ativas (YUSUF et al., 2010). Para o tratamento com 9,0 mM de Fe, houve aumento da fluorescência inicial (F_0) e da fluorescência máxima (F_M) (Fig. 1A e 2). Este aumento pode estar relacionado com o maior índice de clorofila determinado para estas plantas (Tabela 01), corroborando com dados encontrados por NenoVA (2009) para ervilha em presença de altas doses de ferro. De acordo com Briat e colaboradores. (2007), o ferro, dentre outros processos, é essencial na biossíntese da molécula de

clorofila, o que poderia justificar o aumento do índice neste trabalho. Contudo, Chatterjee et al. (2006) observaram diminuição significativa na concentração de clorofila tanto na falta quanto em excesso de ferro em *Solanum tuberosum*.

A análise das curvas de cinética de fluorescência transiente (Figuras 1E e 1G.) permite a identificação do aparecimento da banda L e banda K. A banda L é influenciada pela transferência de energia entre as unidades do FS II, comumente denotada como conectividade e agrupamento (STRASSER; STIRBET, 1998). Este agrupamento é conhecido por ser sensível ao empilhamento ou desempilhamento dos tilacóides como, por exemplo, a resposta a estresse salino demonstrado por Strasser (1981). O aparecimento da banda K (ao redor de 300 μ s) é altamente visível sobre determinados estresses, principalmente alta temperatura e seca como reportado por Srivastava et al. (1997). Uma acentuada banda K pode ser explicada por um desbalanço entre os lados doadores e aceptores de elétrons do FS II (STRASSER, 1997), estando associado à dissociação do complexo de evolução de oxigênio (DE RONDE et al., 2004). O complexo de evolução do oxigênio apresenta o manganês (Mn) como co-fator essencial no processo de oxidação da água (ARMSTRONG, 2008). A análise nutricional em folhas de batata-doce submetidas a 9,0 mM de ferro mostrou uma redução significativa do teor de Mn, provavelmente em função da competição pelo mesmo sítio ativo de absorção com o ferro (capítulo 2). Assim, o aparecimento da banda-K pode estar relacionado com o baixo teor de Mn presente nas folhas. Além disso, Oukarroum et al. (2009) têm sugerido que o aparecimento das bandas L e K pode ser um excelente indicador potencial para identificação de distúrbios fisiológicos antes do aparecimento de danos visuais no caso de estresse por seca.

Todos os tratamentos apresentaram bandas L positivas, com amplitude maior nas plantas submetidas as maiores concentrações de ferro (4,5 e 9,0 mM de Fe). Assim, em outras palavras, o efeito do excesso de Fe pode estar associado à perda da conectividade ou agrupamento entre as unidades ativas do FS II ou mesmo a desorganização da estrutura das membranas dos tilacóides (STRASSER; STIRBET, 1998). O aparecimento da banda-L positiva também foi identificado em plantas de algodão submetidas a condições de déficit hídrico, sugerindo que o sistema fotossintético desta espécie necessita aumentar a dissipação para melhorar a utilização da energia de excitação. A identificação da banda-K positiva (ao redor de 300 μ s) para todos os tratamentos, com maior amplitude para os tratamentos

com 4,5 e 9,0 mM de Fe, reflete a inativação do complexo de evolução de oxigênio e/ou aumento do tamanho da antena funcional do FS II (YUSUF, 2010). Em face dos resultados obtidos pode-se supor que o aparecimento da banda-K esteja relacionado como o aumento da antena funcional do FSII em função também do aumento do índice de clorofila encontrado para os tratamentos com as maiores doses. Desta forma, a interpretação do aparecimento das bandas L e K, mais pronunciadas para as plantas dos tratamentos submetidos às maiores doses de ferro, sugere que a funcionalidade do FSII sofre modificações em virtude de altas (4,5 e 9,0 mM) ou baixas concentrações (0,45 mM) de ferro no meio.

De acordo com Yusuf et al. (2010), a parte O-I da cinética revela mudanças no processo entre o exciton capturado até a redução da PQ, enquanto a fase I-P revela mudanças no fluxo de elétrons da PQH₂ para o acceptor final de elétrons do FSI. Com base nos resultados do presente trabalho, observa-se que a indução do estresse por ferro afetou os processos que envolvem a captura do exciton até a redução da PQ, enquanto o fluxo de elétrons da PQH₂ para o acceptor final de elétrons do FSI não é afetado (Figura 1C).

Além disso, estudos da fase I-P da cinética da fluorescência (Figuras 1H, 1I e 1J) também refletem o tamanho do pool dos aceptores finais do lado acceptor do FSI (STRASSER; STRASSER, 1995). Pelos dados obtidos pode-se inferir que o pool de aceptores finais de elétrons do FSI é maior nos tratamentos submetidos às maiores concentrações de ferro (4,5 e 9,0 mM de Fe), o que instiga maiores investigações a respeito se a proteína ferredoxina poderia ser considerada como acceptor final de elétrons do FSI e se estaria sendo acumulada em virtude das maiores concentrações de ferro. Além disso, nem todos os elétrons que chegam a ferredoxina resultam na formação de NADPH. Os elétrons oriundos da ferredoxina reduzida, que é produzida pelo FSI, podem interagir com várias enzimas ferredoxina-dependente nas assimilações de nitrogênio inorgânico, enxofre, fixação de N₂, e na regulação do ciclo de assimilação de CO₂ (FUKUYAMA, 2004). Também, considerando o fluxo cíclico de elétrons, o qual depende apenas da reação fotoquímica do fotossistema I (MUNEKAGE; SHIKANAI, 2005), os elétrons são reciclados a partir da ferredoxina a plastoquinona, com produção de ATP, porém, sem acumular NADPH (SHIKANAI, 2007). Este fluxo de elétrons pode ter sido intensificado nas plantas do tratamento com a maior concentração de ferro (9,0 mM) em detrimento ao fluxo acíclico de elétrons. Além disso, o fluxo de elétrons

pseudocíclico pode ocorrer em certas condições fisiológicas quando o O_2 recebe os elétrons oriundos da ferredoxina no lugar do $NADP^+$, através de uma reação não-enzimática (FRIDLAND; SCHEIBE, 1999) conhecida como reação de Mehler (1951). Esta reação pode ter um importante papel na proteção dos vegetais sob condições de estresse (HAUPT-HERTING; FOCK, 2002).

A adição de alta concentração de ferro (9,0 mM) causou variação nos parâmetros de fluorescência da clorofila *a* descritos pelo teste JIP. Os parâmetros que descrevem a absorção e eficiência de aproveitamento da energia luminosa foram intensificados para este tratamento em comparação ao controle (0,9 mM). Os dados indicam que: (a) os fluxos específicos por centro de reação foram mais eficientes, principalmente no que se refere ao fluxo de redução dos aceptores finais de elétrons do FSI (RE_0/RC); (b) o rendimento quântico do transporte de elétrons também foi intensificado e (c) eficiências com que um exciton capturado pode mover um elétron, na cadeia de transporte de elétrons, até os aceptores finais do FSI também foram mais eficientes, corroborando com as observações relativas ao demonstrando pela diferença cinética da fase IP. Em relação ao rendimento quântico máximo fotoquímico em $t=0$ ($\phi_{P0} = F_V/F_M = TR_0/ABS$), não foram observadas variações entre os tratamentos, indicando que este parâmetro não é bom indicador de estresse por excesso de ferro em plantas de batata-doce.

Dentre os parâmetros de fluorescência da clorofila *a* observados no gráfico de radar (Fig. 2), PI_{ABS} (STRASSER et al., 1999, 2000, 2004) e $PI_{ABS,total}$ (TSIMILLI-MICHAEL; STRASSER, 2008) permitem informações mais completas em relação a funcionalidade do sistema fotossintético da planta. PI_{ABS} inclui os seguintes componentes: a) quantidade de centro de reação fotossintético (RC/ABS); b) o fluxo máximo de energia que atinge o centro de reação do FSII [$\phi_{P0}/(1-\phi_{P0})$] e c) o transporte de elétrons no início da iluminação [$\Psi_0/(1-\Psi_0)$] (STRASSER et al., 1999, 2000, 2004). Enquanto, PI_{total} é o parâmetro mais sensível do teste JIP que mede a performance até os aceptores finais de elétrons do FSI (TSIMILLI-MICHAEL; STRASSER, 2008), ou seja, inclui "potenciais" parciais de conservação de energia e está estreitamente relacionado com o resultado final da atividade da planta, como o crescimento ou a sobrevivência sob condições de estresse (YUSUF, 2010). Um valor negativo de $PI_{ABS,total}$ expressa uma "perda" e um valor positivo expressa um "ganho" na capacidade de conservação de energia (YUSUF, 2010). A Figura 2 mostra que, para o tratamento submetido à maior concentração de ferro (9,0 mM), houve

aumento dos índices, principalmente em relação ao $PI_{ABS_{total}}$. Isto significa que as plantas apresentaram “ganho”, ou seja, maior proporção de elétrons transferidos aos aceptores finais em relação ao número de fótons absorvidos.

Considerando que as plantas tratadas com 9,0 mM de Fe apresentaram valores de fotossíntese líquida inferiores ao controle (0,9 mM de Fe), porém com dados relacionados a captura, absorção e aproveitamento da energia luminosa mais eficientes, supõem-se que os elétrons da cadeia de transporte tenham potencializado a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), principalmente na forma de $O_2^{\cdot 1}$ (BOWLER; MONTAGU; INZÉ, 1992). Na presença de íons metálicos como o ferro, uma série de reações a mais são desencadeadas resultando na produção de $\cdot OH$ na reação de Haber-Weiss e outras espécies destrutivas como lipoperóxidos (BOWLER; MONTAGU; INZÉ, 1992). As EROs podem ser altamente destrutivas, pois lesionam seriamente vários componentes celulares, dentre eles, lipídeos, proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos, levando a uma diversidade de alterações morfológicas, bioquímicas e fisiológicas (EATON; QIAN, 2002), comprometendo assim, o crescimento e o desenvolvimento das plantas.

5. CONCLUSÃO

As mudanças induzidas pelo excesso de ferro na cinética da fluorescência incluem aumento da fluorescência inicial (F_0) e da fluorescência máxima (F_M), aparecimento das bandas L e K, assim como, aumento na captura do exciton até a redução da PQ (fase O-I da cinética) e no tamanho do pool de aceptores finais do FSI (fase I-P). Também, os parâmetros do teste JIP mostram que há intensificação da captura, absorção e aproveitamento da energia luminosa para essas plantas, principalmente quando revelado pela maior intensidade no $PI_{ABS, total}$. O aumento do índice de clorofila sugere aproveitamento do ferro disponível na biossíntese da clorofila. Por outro lado, a exposição de plantas de batata-doce ao excesso de ferro resultou em queda na taxa assimilatória líquida.

CAPÍTULO 2

ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS, BIOQUÍMICAS E ANATÔMICAS EM PLANTAS DE BATATA-DOCE SUBMETIDAS A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE FERRO

Physiological, biochemical and anatomical changes in sweet potato plants under different concentrations of iron

RESUMO - O presente trabalho teve por objetivo verificar o efeito de diferentes concentrações de ferro sobre características de crescimento, atividade de enzimas antioxidantes e alterações anatômicas em plantas de batata-doce (*Ipomoea batatas* L.). Para tanto, mudas obtidas a partir de ramos apicais de plantas já estabelecidas em casa de vegetação, foram enraizadas em esponja hidropônica, posteriormente transplantadas para um sistema de hidroponia intermitente e irrigadas durante 15 dias com solução nutritiva contendo ferro (EDTA-férrico) nas concentrações de 0,45; 0,9; 4,5 e 9,0 mmol L⁻¹. A altura, área foliar e biomassa total tiveram redução significativa nas concentrações de 4,5 e 9,0 mmol L⁻¹ de ferro. O teor de ferro nas folhas já estabelecidas como em folhas que se desenvolveram após a sua aplicação aumentou significativamente, o qual foi visualizado pelo teste histoquímico. A quantidade dos demais nutrientes também foi afetada, sendo que o manganês apresentou redução mais significativa. Quanto às enzimas antioxidantes, a atividade da superóxido dismutase e ascorbato peroxidase aumentou nas plantas cultivadas com solução de ferro de 9,0 mmol L⁻¹. Ainda nesta concentração, no lado abaxial das folhas houve redução na densidade estomática, porém o diâmetro dos estômatos foi maior. A ultra-estrutura das células radiciais revela o comprometimento das mitocôndrias nos tratamentos com altas concentrações de ferro. Porém, nestas plantas, a ultra-estrutura dos cloroplastos não é afetada.

Palavras-chave: *Ipomoea batatas* L., EDTA-férrico, estresse.

ABSTRACT – The objective of this work was to evaluate the effect of different iron levels at growth characteristics, antioxidant enzymes activity and anatomic changes in *Ipomoea batatas* L. plants. Seedlings already established in the greenhouse were rooted in hydroponic sponge, then transplanted to a hydroponics system and intermittent irrigated during 15 days in nutrient solution containing iron concentrations of 0.45, 0.9, 4.5 and 9.0 mmol L⁻¹ as Fe-EDTA. The height, leaf area and total biomass had a significant reduction in concentrations of 4.5 and 9.0 mmol L⁻¹ of iron. The iron content in leaves established before and in leaves that developed after their application, increased significantly, which can be visualized by histochemical test. The amount of other nutrients was also affected, while manganese decreased more significantly. As regards antioxidant enzymes, superoxide dismutase and ascorbate

peroxidase activity increased in plants grown under iron solution of 9.0 mmol L⁻¹. At this concentration, on the abaxial leaf surface there was also a reduction in stomatal density, but the diameter of the stomata was higher. The ultra structure of root cells reveals the damage of mitochondria in treatments with high concentrations of iron. However, in these plants, the ultra structure of chloroplasts is not affected.

Key words: *Ipomoea batatas* L., Fe-EDTA, stress.

1. INTRODUÇÃO

O ferro é um nutriente essencial para o crescimento e desenvolvimento das plantas. A forma preferencial de absorção pelas raízes das plantas é Fe²⁺ (forma mais solúvel), embora seja absorvido também como Fe³⁺-quelato, sendo translocado para a parte aérea, em sua maior parte, sob a forma de complexos com o citrato (BRIAT; CURIE; GAYMARD, 2007) e, no interior da célula, é armazenado nos cloroplastos, mitocôndrias e nos vacúolos (JEONG; GUERINOT, 2009). Devido a sua capacidade em aceitar e doar elétrons, o ferro participa como cofator de muitas enzimas da cadeia respiratória, da biossíntese do DNA e do metabolismo do nitrogênio, assim como, é essencial no processo fotossintético e na biossíntese da clorofila (JEONG; CONNOLLY, 2009). Várias enzimas envolvidas no metabolismo do nitrogênio e do enxofre, como a redutase do nitrato, redutase do nitrito, redutase do sulfito e nitrogenase, utilizam grupos prostéticos contendo ferro (HÄNSCH; MENDEL, 2009). A sua concentração, nas plantas, está em torno de 30-300 ug g⁻¹ de massa seca (PUGH; DICK; FREDEEN, 2002), mas pode variar dependendo da espécie, genótipo, órgãos, tecidos, e condições de crescimento (HANSCH; MENDEL, 2009).

A homeostase desse metal é fundamental para o crescimento e desenvolvimento dos vegetais, pois tanto o excesso quanto a deficiência são prejudiciais. Uma das causas principais da deficiência é a presença de carbonato no solo, onde o pH é elevado, deixando o ferro indisponível para absorção. Esta indisponibilidade acaba afetando o metabolismo bioquímico e a fisiologia das plantas (MAHMOUDI et al., 2009). Por outro lado, estudos têm demonstrado que as mesmas propriedades químicas que permitem ao ferro atuar como um eficiente cofator e catalisador nas reações redox na célula, também possibilitam sua atuação como potente elemento tóxico (OLALEYE et al., 2009). Esta condição ocorre pelo aumento

da concentração de Fe^{2+} na solução do solo (CRESTANI et al., 2009). O excesso leva à potencialização do estresse oxidativo, com aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), como o superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), radicais hidroxila ($\cdot\text{OH}$), oxigênio singlete (O_2^1) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (ROBELLO; GALATRO, 2007). As EROs podem ser altamente destrutivas, pois lesionam seriamente vários componentes celulares, dentre eles, lipídeos, proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos, levando a uma diversidade de alterações morfológicas, bioquímicas e fisiológicas (FANG et al., 2001).

Todavia, algumas plantas conseguem adaptar-se às condições impostas para sua sobrevivência adquirindo mecanismos de tolerância. No caso de excesso de ferro, uma das formas de limitar os danos causados é interromper a oxidação descontrolada através de enzimas antioxidantes. A primeira enzima de defesa contra danos causados pelas EROs é a superóxido dismutase (SOD), onde o Fe, assim como o Mn, Cu e Zn, é o seu cofator metálico. A SOD é encontrada em vários compartimentos celulares e catalisa a detoxicação do $\text{O}_2^{\cdot-}$ para H_2O_2 e O_2 (SINHA; SAXENA, 2006). Além da SOD, as catalases (CAT) e peroxidases têm recebido maior atenção no que concerne a esse mecanismo de proteção (COSTA et al., 2005). Outra forma de evitar a toxicidade pelo excesso de ferro é armazená-lo na proteína ferritina (CONNOLLY; GUERINOT, 2002).

O excesso de ferro também pode influenciar na absorção de outros nutrientes, como cálcio (Ca), magnésio (Mg), potássio (K), fósforo (P), assim como do próprio ferro, devido à precipitação de óxido de ferro nas raízes da planta, formando uma camada que impede a absorção dos nutrientes (ZHANG; ZHANG; MAO, 1999). Os sintomas dessa deficiência incluem atrofia da planta, redução das brotações, folhas alaranjadas e raízes cobertas por uma camada vermelha de ferro oxidado (VALH, 1991).

Estudos com espécies vegetais têm evidenciado alterações fisiológicas e anatômicas em função das condições ambientais de cultivo (MELO et al., 2007; ADAMSKI; COELHO 2008). Alterações no comportamento estomático também são observadas quando plantas são submetidas a diferentes estresses (CASTRO et al. 2005; MARANHO et al., 2006).

A batata-doce constitui um alimento altamente energético, rico em carboidratos, açúcares, sais minerais e vitaminas A, C e do Complexo B (MIRANDA et al., 1987), sendo cultivada principalmente nas regiões sul e nordeste do Brasil

(SILVA; LOPES; MAGALHÃES, 2002). É uma planta amplamente adaptada a diversas condições de solo em termos nutricionais e de pH (FOLQUER, 1978).

O objetivo deste trabalho foi avaliar características de crescimento e biométricas, atividade de enzimas antioxidantes, absorção de nutrientes e alterações estomáticas e ultra-estruturais em plantas de batata-doce submetidas a diferentes concentrações de ferro.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Para o desenvolvimento deste experimento (outubro de 2009), mudas de batata-doce foram obtidas a partir de ramos apicais de plantas já estabelecidas em casa-de-vegetação, as quais foram enraizadas em esponja hidropônica com água destilada Milli-Q. As mudas foram transplantadas para um sistema de hidroponia intermitente e irrigadas com solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1938), contendo diferentes concentrações de ferro, fornecido na forma de EDTA-férrico, a saber: 0,45 (metade da concentração controle); 0,9 (controle – nível recomendado); 4,5 (cinco vezes a concentração controle) e 9,0 mmol L⁻¹ (10 vezes a concentração controle). O pH das soluções foi ajustado para 5,0, sendo as mesmas renovadas a cada três dias. Foram utilizadas 20 plantas por tratamento, as quais permaneceram nestas condições por 15 dias. Após este período, as plantas foram coletadas e avaliadas quanto ao crescimento, teores de nutrientes nas folhas, atividade de enzimas antioxidantes e características anatômicas.

Os parâmetros de crescimento avaliados foram: o comprimento de ramos (cm), massa seca de parte aérea e de raízes (g) e área foliar (cm²) estimada utilizando-se de medidor de área foliar Li-Cor, modelo LI-3100.

As concentrações de macro e micronutrientes foram avaliadas a partir da massa seca de folhas conforme metodologia descrita por Tedesco et al. (1995). Para observar o efeito das diferentes concentrações do ferro, os nutrientes foram quantificados em folhas já estabelecidas antes da aplicação dos tratamentos com ferro (denominada folhas velhas) e em folhas que se desenvolveram após a aplicação do ferro (denominada folhas novas).

A atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX) e catalase (CAT) foi determinada em dois períodos distintos, após sete e 15 dias de aplicação dos tratamentos. Aproximadamente 0,2 g

de tecido fresco de folhas de batata-doce, desenvolvidas após a aplicação do ferro foram macerados em N₂ líquido acrescido de 20% de PVPP (Polivinilpolipirrolidona) e homogeneizados em 1,5 mL no tampão de extração que continha fosfato de potássio 100 mM (pH 7,0), EDTA 0,1 mM e ácido ascórbico 10 mM. O homogeneizado foi centrifugado a 13.000 g por 10 min a 4°C e o sobrenadante coletado para determinar a atividade das enzimas.

A atividade da SOD foi avaliada pela capacidade da enzima em inibir a fotorredução do azul de nitrotetrazólio (NBT) (GIANNOPOLITIS; RIES, 1977) em um meio de reação composto por fosfato de potássio 100 mM (pH 7,8), metionina 14 mM, EDTA 0,1 μM, NBT 75 μM e riboflavina 2 μM. Os tubos com o meio de reação e a amostra (30 uL), totalizando 2 mL de volume total, foram iluminados por sete minutos em uma caixa adaptada com lâmpada fluorescente de 20 W. Para o controle, o mesmo meio de reação, porém sem a amostra foi iluminado e, como branco, foi utilizado um tubo com meio de reação mantido no escuro, também utilizado para zerar o espectrofotômetro. As leituras foram realizadas a 560 nm. Uma unidade da SOD foi considerada a quantidade de enzima capaz de inibir em 50% a fotorredução do NBT nas condições de ensaio.

A atividade da CAT foi determinada conforme descrito por Azevedo et al. (1998) com algumas modificações, onde a atividade foi monitorada pelo decréscimo na absorbância a 240 nm, durante 2 minutos em meio de reação (volume do extrato 50 uL, totalizando 4 mL de volume total) incubado a 28°C, contendo 100 mM de tampão fosfato de potássio (pH 7,0) e 12,5 mM de H₂O₂.

A atividade da APX foi realizada segundo Nakano e Asada (1981), monitorando-se a taxa de oxidação do ascorbato a 290 nm. O tampão de incubação foi composto por fosfato de potássio 100 mM, pH 7,0, ácido ascórbico 0,5 mM e H₂O₂ 0,1 mM (volume do extrato 50 uL, totalizando 4 mL de volume total).

Para a análise ultra-estrutural, amostras de raízes e folhas novas foram fixadas em solução de Karnovsky (glutaraldeído 2,5%; formaldeído 2,5% e cacodilato 0,05 M, pH 7,2), durante 24 horas. Em seguida, lavadas em tampão cacodilato e pós-fixadas em solução de tetróxido de ósmio 2%, por cinco horas. Posteriormente, as amostras foram desidratadas em soluções de acetona (25, 50, 75, 90 e 100 %) e submetidas a uma série de soluções crescentes de resina Spurr, diluída em acetona (30, 70 e 100%). Os cortes foram feitos em ultramicrótomo (Reichert-Jung), fixados em grades de cobre de 300 mesh e contrastados com

acetato de uranila (3%) e acetato de chumbo (3%), durante 3 minutos cada. Para avaliação, utilizou-se microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM-109, na Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS.

Para as avaliações estomáticas, foram coletadas folhas novas, completamente expandidas, do segundo ou terceiro nó, as quais foram fixadas em álcool 70%. Os cortes paradérmicos foram realizados manualmente no terço médio das folhas, clarificados em solução de hipoclorito de sódio 5% e cada secção corada com solução de azul de toluidina 0,05% em tampão fosfato 0,1 M (KRAUS; ARDUIM, 1997) e as lâminas montadas em Glicerina 50%. A densidade estomática foi expressa pelo número de estômatos por mm^2 . Para esta análise foi utilizado microscópio óptico Zeiss, modelo Axiostar Plus e câmera digital Sony, modelo Mpeg movie EX, 3.3 Megapixels. Utilizaram-se campos de $0,158 \text{ mm}^2$ para contagem dos estômatos. Para a densidade estomática nas epidermes abaxial e adaxial, foram observados dois campos de cinco plantas por tratamento e para o diâmetro polar (comprimento das células-guarda) e equatorial (largura das células-guarda), foram utilizadas cinco plantas por tratamento, sendo medidos, em média, cinco estômatos por planta. O programa de medidas *Image Tool* para Windows, versão 3.00 foi utilizado para as medidas.

Para a detecção histoquímica do ferro, coletaram-se fragmentos foliares da região mediana de folhas localizadas no terceiro ou quarto nó (três folhas por tratamento), sendo as amostras fixadas em Karnovsky (RUZIN, 1999). Cortes transversais de cada fragmento foram efetuados em micrótomo de Ranvier e submetidos a uma solução constituída de ferrocianeto de potássio e ácido clorídrico a 4%. Após 24 horas, os cortes foram lavados em água destilada, montados em água glicerinada 50% e observados em microscópio óptico (Zeiss, modelo Axiostar Plus) equipado com câmera digital (Sony, modelo Mpeg movie EX, 3.3 Megapixels). A reação foi considerada positiva nas regiões dos cortes que apresentaram coloração azul, característico do azul de Prússia.

Os dados relacionados aos parâmetros de crescimento, teores de nutrientes, e densidade e tamanho dos estômatos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Os resultados relacionados a atividade das enzimas antioxidantes foram submetidos a análise da variância ($p \leq 0,5$); quando significativos, estes foram testados por modelos de regressão polinomial (MACHADO; CONCEIÇÃO, 2007). A escolha dos modelos

baseou-se na significância estatística (teste F) e no ajuste do coeficiente de determinação (R^2).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A exposição das plantas de batata-doce às concentrações de ferro (Fe) de 4,5 e 9,0 mmol L^{-1} , durante 15 dias, ocasionou sintomas típicos de toxidez por ferro, como o aparecimento do bronzeamento e lesões nas folhas mais velhas. Estes sintomas ocorreram associados ao decréscimo no comprimento dos ramos, área foliar e massa seca da parte aérea e raízes observadas nestas mesmas concentrações (Fig. 1).

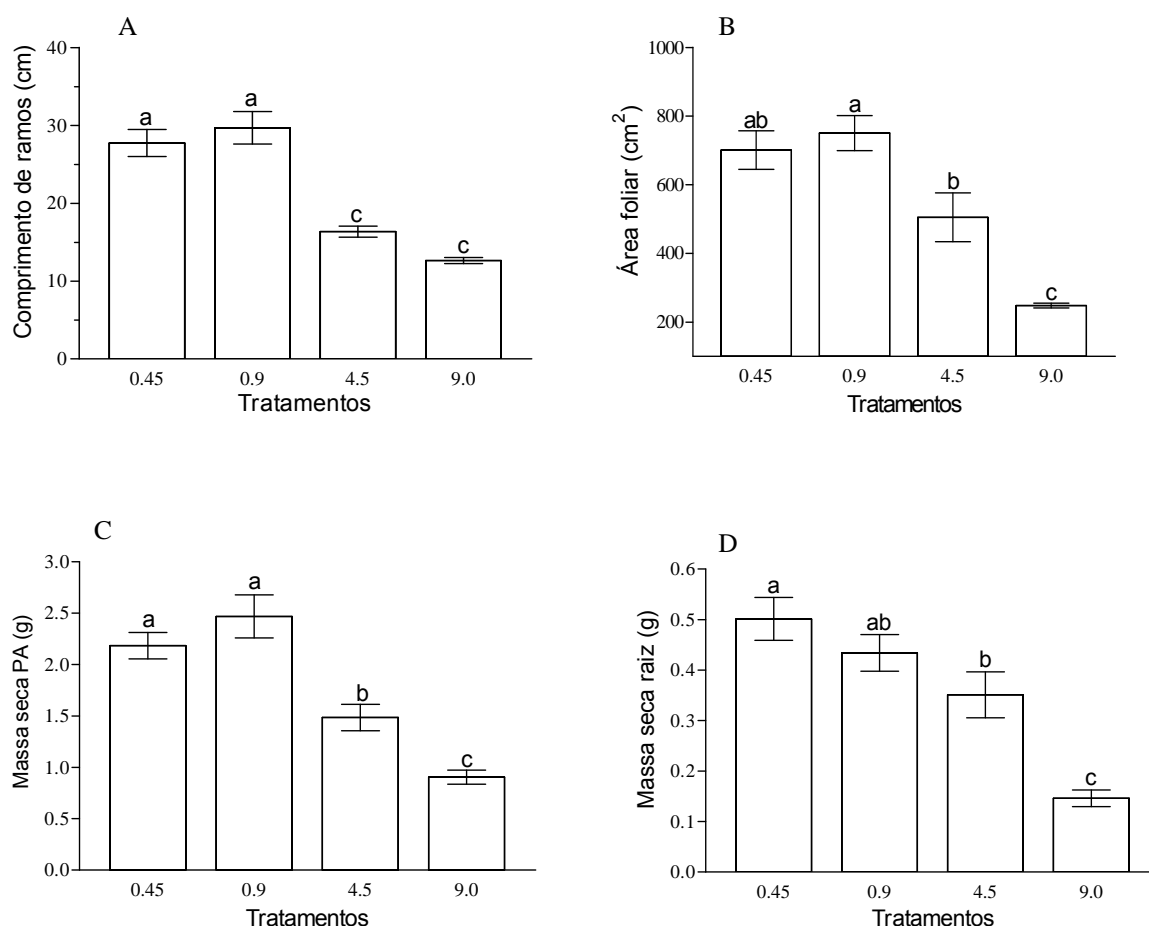


Figura 1 - Comprimento de ramos (A), área foliar (B), massa seca da parte aérea (C) e raiz (D) de batata-doce em função da concentração de ferro (mmol L^{-1}). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$), dentro de cada característica avaliada.

A redução no crescimento pode estar diretamente relacionada com os altos níveis de ferro verificado nos tecidos foliares (Tab. 1; Fig. 4). Para o tratamento com $9,0 \text{ mmol L}^{-1}$, a concentração desse nutriente nas folhas já estabelecidas durante a aplicação dos tratamentos, foi de $349,1 \text{ mg Kg}^{-1}$ de massa seca. Para plantas de arroz, valores entre $300\text{-}500 \text{ mg Kg}^{-1}$ são considerados críticos para toxicidade (DOBERMANN; FAIRHUST, 2000). Porém, de acordo com Pugh et al. (2002), o nível crítico para as plantas estaria acima de 500 mg Kg^{-1} de massa seca. Estes dados podem indicar que existe variação entre as espécies e as condições de crescimento. Apesar das plantas do tratamento com $9,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de Fe também apresentarem um valor significativamente maior de ferro na biomassa seca das folhas que se desenvolveram após a aplicação dos tratamentos ($186,9 \text{ mg Kg}^{-1}$ de massa seca) o valor é menor quando comparado com as folhas já estabelecidas, ou seja, com as folhas mais velhas (Tab. 1). Em plantas, a distribuição de micronutrientes para o desenvolvimento de órgãos em crescimento depende, em grande parte, do transporte do floema (KRÜGER et al., 2002). Maior acúmulo de ferro em raízes e folhas também foi verificado por Carli (2008), estudando o cultivo de *Ipomea pes-caprae* em solução hidropônica com excesso de ferro (acima de $2 \mu\text{M}$ de Fe-EDTA). Ainda segundo o autor, com a saturação do ferro na raiz, há limitação da sua absorção e transporte até as folhas, o que pode justificar os menores teores encontrados nas folhas mais novas, devido sua baixa mobilidade. Assim, os dados deste trabalho podem indicar um possível controle através da sinalização e transporte deste elemento entre os diferentes tecidos e órgãos (CONNOLLY; GUERINOT, 2002; BRIAT; CURIE; GAYMARD, 2007).

O aumento da concentração de ferro também modificou os teores de outros nutrientes nas folhas. Para as folhas já estabelecidas (folhas velhas) quando da aplicação dos tratamentos (Tab. 1), houve diminuição dos teores de K, Ca, Mg para o tratamento com $9,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de Fe e diminuição de Mg e Mn para os tratamentos com $4,5$ e $9,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de Fe, entretanto os teores de N e Cu não diferiram entre os tratamentos. Para as folhas que se desenvolveram após a aplicação dos tratamentos (folhas novas) (Tab. 1), os teores de P e Ca aumentaram, enquanto que Mn diminuiu com as maiores concentrações de ferro. As análises de N, K, Cu e Zn mostraram que para estes não houve diferença entre os tratamentos.

Tabela 1 – Teores de nutrientes minerais presentes na massa seca de folhas de batata-doce em função da concentração de ferro

	Tratamentos (mmol L ⁻¹ de EDTA-férrico)							
	0,45	0,9	4,5	9,0	0,45	0,9	4,5	9,0
	Folha velha				Folha nova			
N*	39,09a*	43,96a	39,58a	30,71a	41,85a	54,04a	48,64a	47,12a
P*	7,4ab	6,19b	7,15ab	7,59a	6,92a	6,07a	9,30b	10,68b
K*	73,97a	64,7ab	69,82a	55,5b	81,5a	77,31a	74,92a	76,65a
Ca*	25,5a	23,4a	22,84a	19,4b	15,5ab	12,6b	13,51b	16,78a
Mg*	6,49b	7,26a	5,9c	4,29d	4,99a	4,8ab	4,5ab	4,16b
Cu**	13,61a	11,7a	9,18a	10,7a	15,8a	18,05a	15,83a	16,15a
Zn**	56,48a	48,45ab	48,4ab	44,02b	48,7a	42,36a	26,85a	42,64a
Fe**	118,9a	199,2a	207a	349,1b	108,1a	108,13a	144,3a	186,9b
Mn**	321,9a	388,02a	152,5b	67,22b	159,2a	191,0a	83,7b	37,74b

* g Kg⁻¹ de massa seca, ** mg Kg⁻¹ de massa seca, * Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05), dentro de cada tipo de folha.

Algumas plantas exibem mecanismos de adaptação ou resistência que conseguem sobrepor os efeitos do estresse por excesso de ferro. Uma das formas é a oxidação de Fe²⁺ na rizosfera, formando uma placa, a qual pode evitar a absorção excessiva do próprio ferro (DOBERMANN; FAIRHURST, 2000). A placa possui propriedades químicas e físicas similares aos óxidos de ferro encontrados no solo, tornando-a também capaz de adsorver outros íons (LIU; ZHANG; ZHANG, 2007). Neste estudo, foi observada redução significativa do Mn na massa seca da parte aérea das plantas com as maiores concentrações de ferro, indicando uma possível influência da barreira de óxido de ferro na absorção desse nutriente. Além disso, o Fe e o Mn competem pelo mesmo sítio de ligação fisiológico (BASER; SOMANI, 1982), o que pode ter inibido a absorção e a translocação do Mn para a parte aérea. Resultados semelhantes foram encontrados para *Solanum tuberosum* (CHATTERJEE; GOPAL; DUBE, 2006).

De acordo com Krüeger et al. (2002), foi identificada, no floema de *Ricinus communis*, uma proteína de ligação e transporte de Fe²⁺, a qual pode ligar-se também aos metais Cu²⁺, Zn²⁺ Mn²⁺. Nas folhas de batata-doce submetidas as

diferentes concentrações de ferro, não foi verificada diferença estatística nos teores de Cu e Zn, indicando que o transporte destes metais, não foi alterado.

A alteração verificada nos níveis de alguns nutrientes na parte aérea também pode ter contribuído para a redução do desenvolvimento das plantas.

Mecanismos de tolerância dos tecidos foliares a níveis elevados de ferro, como a indução do sistema antioxidante, têm sido sugeridos como elementos importantes em diversas espécies para tolerar os altos níveis de ferro, dado que o ferro é capaz de gerar espécies reativas de oxigênio (EROs), principalmente o radical hidroxila (OH^{\bullet}) por se ligar a vários pequenos quelantes (STEIN et al., 2009). Desta forma, a ação sincronizada das enzimas antioxidantes é essencial para a remoção das EROs. No presente experimento, a variável-resposta SOD apresentou interação significativa entre os dias de avaliação e as concentrações testadas (Fig. 2A). Após quinze dias de aplicação dos tratamentos, sua atividade aumentou 21,37% no tratamento com $4,5 \text{ mmol L}^{-1}$ e 48,12% no tratamento com $9,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de Fe (Fig. 2A). A análise da variância também demonstrou interação significativa entre os dias de avaliação e as concentrações testadas para a atividade da APX (Fig. 2C). Observa-se aumento em sua atividade conforme o aumento da concentração de ferro nos dois períodos de avaliação, sendo que na maior concentração ($9,0 \text{ mmol L}^{-1}$) houve aumento de 84,16% após sete dias e de 38,81% após quinze dias de aplicação dos tratamentos. Para a variável-resposta CAT não houve interação significativa entre os dias de avaliação e as concentrações testadas (Fig. 2B). Porém, sua atividade apresentou aumento de 25% no tratamento com $4,5 \text{ mmol L}^{-1}$ e diminuição de 5,83% para o tratamento com $9,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em relação ao controle ($0,9 \text{ mmol L}^{-1}$).

A SOD vem sendo considerada como a primeira enzima de defesa antioxidante em plantas, dismutando dois radicais superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) até oxigênio molecular (O_2) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (SINHA, 2006). No presente experimento, após quinze dias de aplicação dos tratamentos, a adição de alta dose de ferro, estimulou significativamente a atividade da SOD em folhas de batata-doce, conferindo a essa enzima um importante papel na proteção contra o estresse oxidativo (Figura 2A). Sinhá et al (1997) também relataram um aumento da atividade da SOD em plantas de *Hydrilla verticillata* cultivadas em presença de ferro. Por outro lado, efeito inibitório do ferro sobre a atividade da SOD foi observado em *Bacopa*

monnieri, *Eugenia uniflora* e *Helianthus annuus* (GALLEGO; BENAVIDES; TOMARO, 1996; SINHA; SAXENA, 2006; NEVES et al, 2009).

O H_2O_2 também é tóxico para a célula e deve ser detoxificado. Este processo é feito pela catalase (CAT) e/ou peroxidase (APX). A CAT e a APX pertencem a duas diferentes classes de enzimas de limpeza devido as suas diferentes afinidades pelo H_2O_2 , com a APX na ordem μM e a CAT em mM. Assim, enquanto a APX seria responsável pela modulação refinada das EROs para a sinalização, a CAT seria responsável pela remoção do excesso de EROs gerado durante o estresse (MITTLER, 2002).

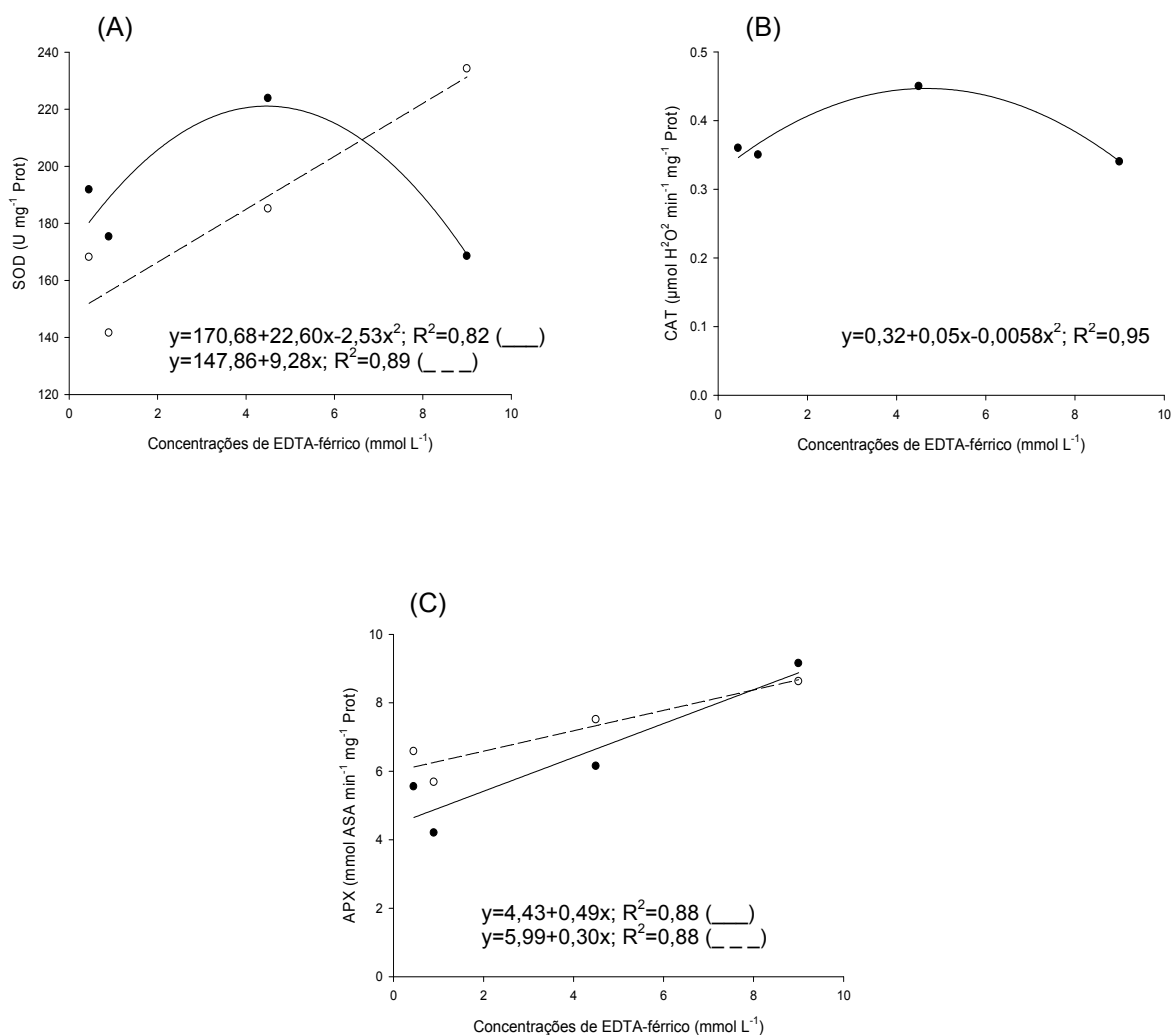


Figura 2 – Atividade enzimática em folhas de batata-doce cultivada em solução nutritiva com EDTA-férrico após sete dias (___ e ●) e após quinze dias (--- e ○) de aplicação nas concentrações de 0,45; 0,9; 4,5 e 9,0 mmol L⁻¹. (A) Atividade da superóxido dismutase (SOD); (B) Atividade da catalase (CAT) e (C) Atividade da peroxidase do ascorbato (APX).

Segundo Chatterjee et al (2006), com a diminuição do substrato a síntese da CAT é bloqueada, o que corrobora com os resultados obtidos em nosso trabalho onde, na maior concentração de ferro ($9,0 \text{ mmol L}^{-1}$) houve redução da atividade da CAT devido à redução dos níveis de H_2O_2 pelo aumento na atividade da APX (Fig. 2B e C). Desse modo, relacionando a atividade da CAT e APX com a concentração de H_2O_2 nas células, pode-se inferir que houve uma variação na concentração de H_2O_2 nas plantas de batata-doce expostas a maior concentração de ferro ($9,0 \text{ mmol L}^{-1}$) e, com isso, variação na atividade dessas enzimas. Dados semelhantes para a atividade da CAT e APX foram obtidos por Chatterjee et al (2006) quando da exposição de *Solanum tuberosum* ao estresse por ferro.

Quanto à anatomia, as folhas de batata-doce caracterizam-se por serem anfiestomáticas com estômatos paracíticos (GLÓRIA; GUERREIRO, 2006). A adição de elevada concentração de Fe no meio nutritivo ($9,0 \text{ mmol L}^{-1}$) ocasionou uma diminuição da densidade estomática no lado abaxial das folhas (Fig. 3), sendo que no lado adaxial não houve diferença entre os tratamentos (Tab. 2). O diâmetro (polar e equatorial) dos estômatos do lado abaxial das folhas apresentou aumento para os tratamentos com as maiores concentrações de ferro ($4,5$ e $9,0 \text{ mmol L}^{-1}$). Em relação ao diâmetro equatorial adaxial, não houve diferença entre os tratamentos. Já para o diâmetro polar adaxial, o tratamento submetido a menor concentração de ferro ($0,45 \text{ mmol L}^{-1}$) apresentou o maior valor (Tab. 2). Nas espécies vegetais, os estômatos são estruturas importantes para o crescimento e desenvolvimento, pois têm papel preponderante ao regular simultaneamente o fluxo transpiratório para a atmosfera e o fluxo de CO_2 para o interior da folha (SILVA; ALQUINI; CAVALLET, 2005). Estas estruturas podem variar em forma, tamanho e quantidade em função de fatores abióticos, o que acarreta variações nas condições fotossintéticas (LARCHER, 1986). Trabalhos têm mostrado que o estresse hídrico (MELO et al, 2007), poluição atmosférica (ALVES; TRESMONDI; LONGUI, 2008), fotoperíodo (CASTRO et al, 2005), adubação orgânica e mineral (ROSOLEM; LEITE, 2007; CÔRREA et al., 2009) podem provocar alterações na densidade dos estômatos. Em batata-doce, observou-se que na epiderme abaxial, que concentra geralmente maior densidade estomática, houve redução do número de estômatos por mm^2 à medida que se elevaram as doses de ferro (Tab. 2 e Fig. 3). Tem sido reportado que a densidade estomática também está correlacionada inversamente com o tamanho em comprimento das células-guarda (GALMES et al. 2007). No presente trabalho foi

encontrado maior diâmetro, tanto polar quanto equatorial, para os estômatos da face abaxial das plantas do tratamento com 4,5 e 9,0 mmol L⁻¹ de Fe (Tab. 2), mostrando uma possível relação inversa entre densidade estomática e diâmetro dos estômatos. Assim, a presença de altas concentrações de ferro, durante o crescimento da folha, pode ter provocado alterações bioquímicas, as quais influenciaram o desenvolvimento normal dos tecidos e, conseqüentemente, dos estômatos. Considerando o fato de que algumas plantas necessitam se adaptar morfofisiologicamente a determinadas condições de estresse, a menor densidade estomática pode ter sido compensada, pelo menos em parte, com o aumento no diâmetro dos estômatos.

Tabela 2 - Densidade e diâmetros dos estômatos (média ± erro padrão) de batata-doce em função da concentração de ferro

Característica avaliada	Tratamentos (mmol L ⁻¹ de Fe)			
	0,45	0,9	4,5	9,0
Epiderme adaxial				
Dens. Est. Ad. (n ^o /mm ²)	8,5±1,1a*	7,9±0,7a	8,6±0,5a	7,1±0,8a
DPEEAd (µm)	34,7±0,5a	32±0,6b	33,1±0,4ab	32,2±0,7b
DEEEAd (µm)	24,7±0,3a	24,2±0,2a	23,9±0,2a	25±0,3a
Epiderme abaxial				
Dens. Est. Ab. (n ^o /mm ²)	24±1,5a	24,2±1,8a	22,3±1,3a	13,7±1,3b
DPEEAb (µm)	30,7±1a	32,7±0,6a	35,9±0,6b	35,9±0,6b
DEEEAb (µm)	23,2±0,3a	23,3±0,2a	24,9±0,4b	26,7±0,5c

Dens. Est. Ad.: densidade estomática da epiderme adaxial; DPEEAd = diâmetro polar dos estômatos da epiderme adaxial; DEEEAd = diâmetro equatorial dos estômatos da epiderme adaxial; Dens. Est. Ab.: densidade estomática da epiderme abaxial; DPEEAb = diâmetro polar dos estômatos da epiderme abaxial; DEEEAb = diâmetro equatorial dos estômatos da epiderme abaxial; * - Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).

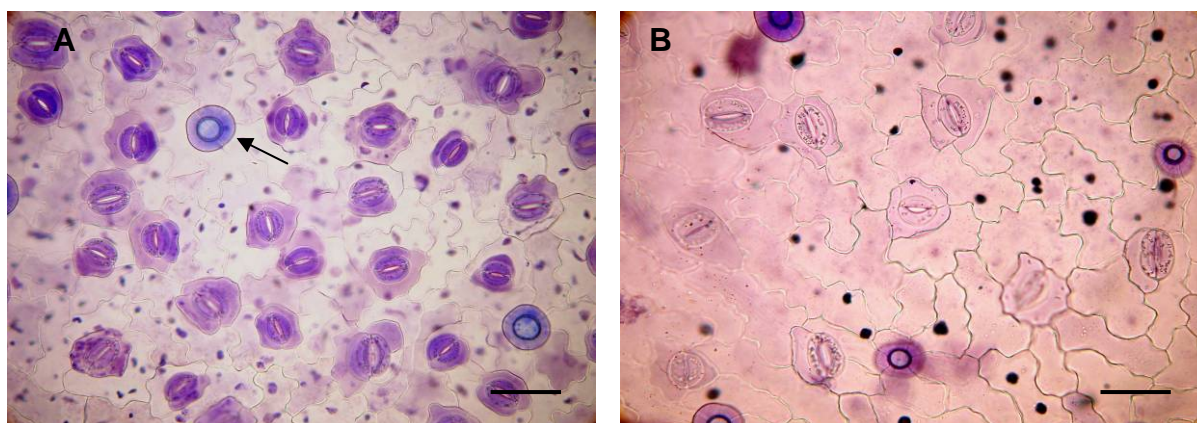


Figura 3 - Seções paradérmicas da epiderme da face abaxial de folhas de batata-doce. (A) Epiderme de planta cultivada em $0,9 \text{ mmol L}^{-1}$ de Fe (controle). (B) Epiderme de planta cultivada em $9,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de Fe (10 x a concentração controle). A seta indica tricoma glandular. Barra = $50 \mu\text{m}$.

O método histoquímico do Azul de Prússia pode ser considerado complementar para o entendimento dos processos que envolvem o acúmulo e a toxidez ao excesso de ferro nos tecidos vegetais por ser um método confiável e sensível para sua localização, sendo que quantidades muito pequenas podem ser detectadas microscopicamente, permitindo assim, caracterizar temporal e espacialmente a distribuição do elemento nos tecidos (KRISHNAN et al 2003; SIVAPRAKASH et al., 2006). De fato, no presente trabalho, verificou-se o acúmulo de ferro nos tecidos do limbo das plantas expostas às diferentes concentrações desse nutriente, ou seja, de todos os tratamentos. Nas figuras 4A e 4B evidencia-se a presença de ferro nas células epidérmicas, feixes vasculares, parênquima paliçádico e lacunoso, assim como no córtex parenquimático da nervura central de plantas do tratamento com $9,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de Fe, fato que confirma a absorção deste elemento.

A presença de ferro nos tecidos fotossintetizantes (parênquima paliçádico) deve-se possivelmente ao acúmulo deste metal nos cloroplastos, local de maior armazenamento (BRIAT; CURIE; GAYMARD, 2007). A presença do ferro observada no floema deve-se à função desse tecido na sua redistribuição. A histolocalização observada em plantas de batata-doce expostas às diferentes concentrações de ferro também foi verificada por Silva et al. (2006) nas espécies de restinga *Byrsonima sericea*, *Cordia verbenacea* e *Psidium guineense* expostas às emissões de material particulado de ferro e por Carli (2008) em *Ipomoea pes-caprae* cultivada em concentrações crescentes deste nutriente.

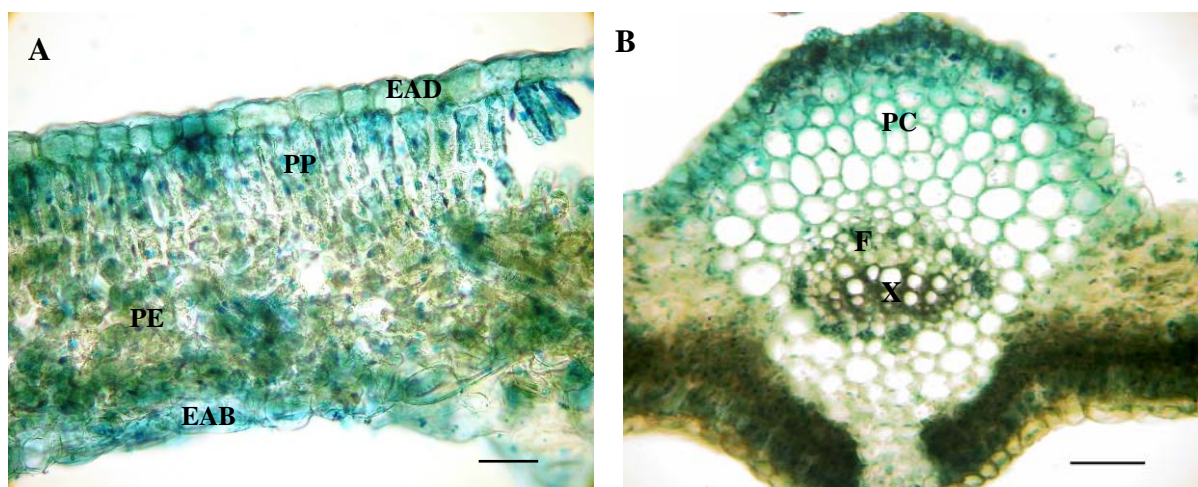


Figura 4 – (A-B) Cortes transversais da folha de batata-doce cultivada em $9,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de Fe e submetidos ao azul de Prússia. Observar a reação positiva nos tecidos fotossintéticos (A), bem como no floema (B). EAD – epiderme da face adaxial da folha, EAB – epiderme da face abaxial da folha, PP – parênquima paliádico, PE – parênquima esponjoso, PC – parênquima cortical, F – Floema, X – Xilema. Barra = $50 \mu\text{m}$.

As imagens geradas através da microscopia eletrônica de transmissão de células do córtex radicial de batata-doce são apresentadas na figura 5. Nas plantas dos tratamentos com $0,45$ (metade da concentração controle) e $0,9 \text{ mmol L}^{-1}$ de Fe (controle) mitocôndrias com estrutura típica (membrana externa lisa e membrana interna altamente dobrada denominada cristas) próximas à periferia das células são evidentes (Fig. 5A, 5B e 5E). No entanto, para os tratamentos com altas concentrações de EDTA-férrico ($4,5$ e $9,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de Fe), manchas escuras, provavelmente de ferro precipitado, são observadas em grande quantidade dentro das células e as membranas mitocondriais não são visíveis (Fig. 5C, 5D e 5F).

Semelhante aos cloroplastos, as mitocôndrias têm uma demanda grande por ferro (cofator na cadeia de transporte de elétrons e formação de agregados Fe-S) e devem manter a sua homeostase a fim de evitar a formação de EROs, armazenando o excesso de ferro (JEONG; GUERINOT, 2009). Nas plantas de batata-doce, as concentrações de $4,5$ e $9,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de EDTA-férrico usadas podem ser consideradas tóxicas para as mitocôndrias, pois as mesmas tiveram sua ultra-estrutura completamente alterada (Fig. 5D e 5F). O excesso de ferro pode ter potencializado a formação de radicais livres e, com isso, a degradação dos constituintes celulares da raiz, com o comprometimento inclusive do metabolismo respiratório.

Segundo Souza-Santos et al. (2001), o excesso de ferro pode induzir a peroxidação de lipídios, alterando a estrutura e a permeabilidade das membranas. Como nas folhas foi observado aumento da atividade das enzimas SOD e APX (Fig 2A e C) em função da maior produção de EROs no tratamento mais elevado de ferro, nas raízes o estresse oxidativo pode ter sido mais severo e, assim, as EROs não foram detoxificadas eficientemente, levando a degradação das membranas. Este fato pode ter contribuído para as alterações ultra-estruturais encontradas nas raízes de batata-doce. Também, a redução na massa seca das raízes, observada nas plantas dos tratamentos com as maiores concentrações de ferro (Fig. 1D), pode estar relacionada com o comprometimento do metabolismo das células deste órgão, dados estes também observados em trigo na presença de altas concentrações de alumínio (LI et al., 2008).

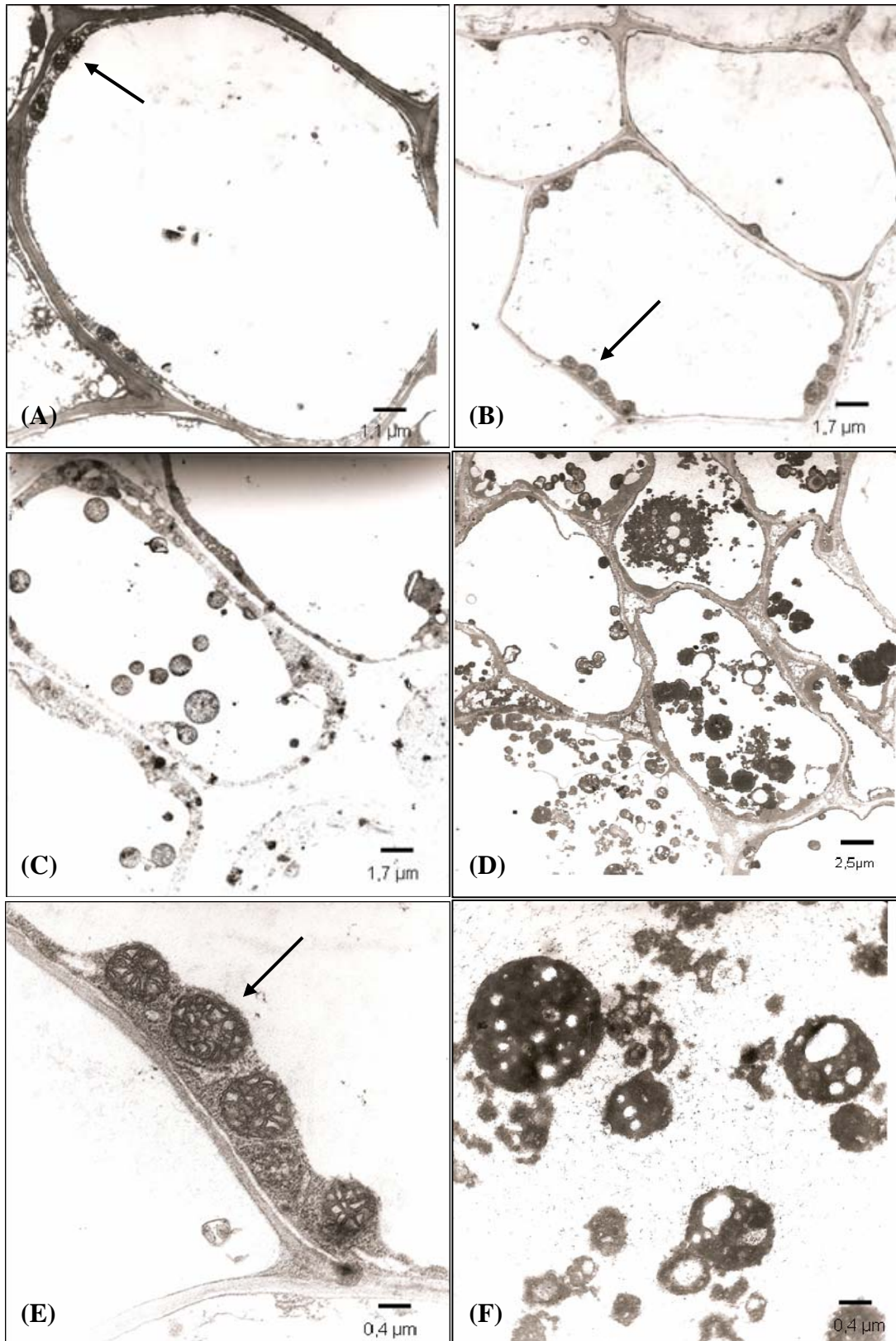


Figura 5 - Eletromicrografia de transmissão de células do córtex radicial de plantas expostas a diferentes concentrações de EDTA-férrico. (A) $0,45 \text{ mmol L}^{-1}$. (B e E) $0,9 \text{ mmol L}^{-1}$. (C) $4,5 \text{ mmol L}^{-1}$. (D e F) $9,0 \text{ mmol L}^{-1}$. A seta indica mitocôndrias.

A ultra-estrutura das células do mesofilo é apresentada na figura 6. Observa-se que os cloroplastos das plantas de todos os tratamentos com ferro apresentam-se elipsóides com arranjo típico do grana e estroma, com grãos de amido presentes (Fig. 6A-F). No entanto, pontos elétron-denso são observados no estroma dos cloroplastos das plantas do tratamento com $9,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de ferro que poderiam corresponder ao acúmulo de ferritina (Fig. 6D). As ferritinas são proteínas presentes nas plantas e têm como função seqüestrar o excesso de ferro absorvido pelas células (DUY et al., 2007; AMILS et al., 2007), impossibilitando a formação de radicais livres via reação de Fenton. Segundo diferentes autores, as ferritinas nas folhas, tanto na forma cristalina como não-cristalina, estão localizadas principalmente nas mitocôndrias e nos cloroplastos (MASSOVER, 1993; ZANCANI et al., 2004). A importância da proteína ferritina na proteção ao estresse oxidativo mediado por ferro também foi recentemente demonstrada por Ravet et al. (2009), que mostrou que as ferritinas são essenciais para a proteção das células e que a sua falta leva a uma redução no crescimento e defeitos no desenvolvimento reprodutivo, provavelmente devido à toxidez por excesso de ferro.

Além disso, quando plantas de batata-doce foram expostas à elevada concentração de ferro ($9,0 \text{ mmol L}^{-1}$), o índice de clorofila foi maior e os parâmetros do teste JIP, que descrevem a absorção e eficiência de aproveitamento da energia luminosa, foram intensificados nestas plantas, indicando uma melhor eficiência na captura, absorção e aproveitamento da energia luminosa (capítulo 1). Assim, esses resultados indicam que plantas de batata-doce quando submetidas a altas concentrações de ferro não apresentam sinais de toxidez, nas folhas que se desenvolveram após a aplicação dos tratamentos, que possam comprometer a ultra-estrutura dos cloroplastos e as reações luminosas da fotossíntese.

Considerando os dados da ultra-estrutura, observa-se que o acúmulo de ferro e a sua fitotoxicidade ocorreu principalmente nas células das raízes, com sérios danos à estrutura das mitocôndrias.

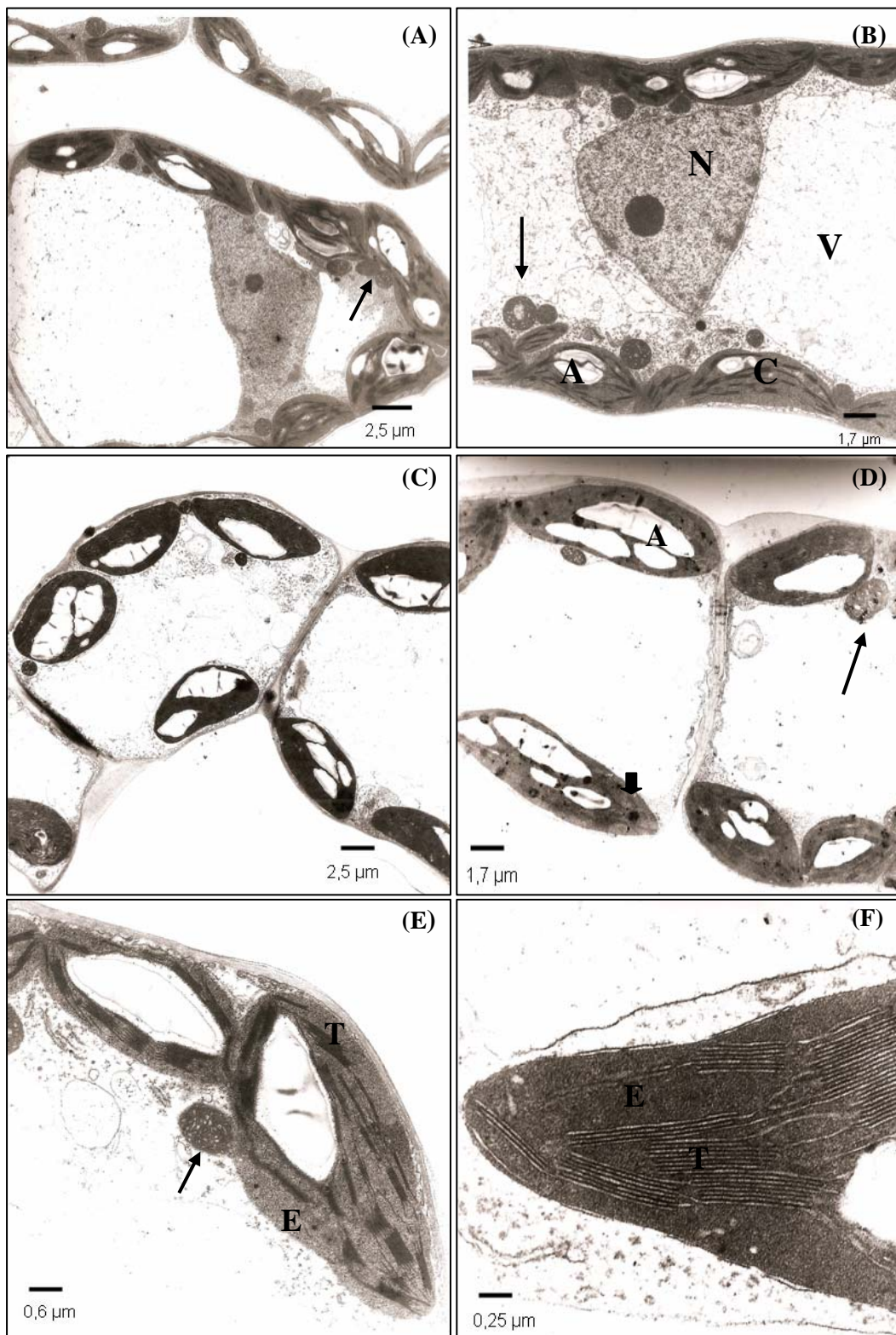


Figura 6 - Eletromicrografia de transmissão de cloroplastos de plantas expostas a diferentes concentrações de EDTA-férrico. (A) 0,45 mmol L⁻¹. (B e E) 0,9 mmol L⁻¹. (C) 4,5 mmol L⁻¹. (D e F) 9,0 mmol L⁻¹. A seta fina indica mitocôndria e a seta grossa possível acúmulo de ferro na proteína ferritina. C – cloroplasto, A – grão de amido, N – núcleo, V – vacúolo, E – estroma, T – tilacóides.

5. CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo sugerem que elevadas concentrações de ferro promoveram reduções significativas no crescimento das plantas e na densidade estomática. Alterações estas que podem ter ocorrido como consequência do estresse oxidativo, visto que aumento da atividade de enzimas antioxidantes foi observado. A toxidez por excesso de ferro também interferiu na absorção dos demais nutrientes, principalmente do Mn. Altos níveis de ferro foram determinados nas folhas, tanto quantitativamente como qualitativamente através do teste histoquímico. A ultra-estrutura dos cloroplastos é mantida na presença de elevadas concentrações de ferro, no entanto, as mitocôndrias das raízes têm a ultra-estrutura completamente comprometida.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A manutenção da homeostase do ferro é essencial para as atividades metabólicas, tais como a fotossíntese, que é a base do crescimento e desenvolvimento dos vegetais. O ferro é fundamental neste processo, pois participa da constituição de proteínas e pigmentos que estão diretamente ligados ao processo fotossintético. No entanto, este micronutriente pode tornar-se extremamente tóxico quando em excesso. Plantas de batata-doce, na presença de altas concentrações de ferro, apresentaram melhor eficiência nos processos que envolvem a captura, absorção e aproveitamento da energia luminosa, assim como, no aumento do índice de clorofila, comprovando a sua importância na primeira etapa da fotossíntese (reações luminosas). Porém, a queda na taxa assimilatória líquida, nestas plantas, pode indicar que o excesso de ferro comprometeu a segunda fase da fotossíntese (reações de carboxilação), resultando em perdas na produção de biomassa e na densidade estomática. Além disso, a presença de altos níveis de ferro em seus tecidos foliares pode ter desencadeado um aumento na formação de espécies reativas de oxigênio, responsáveis pela oxidação de macromoléculas biológicas, visto que aumento na atividade de enzimas antioxidantes foi determinado. Grandes quantidades de ferro também provocaram distúrbios nutricionais nas plantas, principalmente em relação ao Mn, o qual compete com íons de ferro pelos mesmos sítios ativos de absorção presentes nas membranas plasmáticas das células radiciais. Nestas células, a microscopia eletrônica de transmissão revelou a presença de grandes quantidades de manchas escuras, provavelmente de ferro precipitado, com o comprometimento da ultra-estrutura das mitocôndrias.

Assim, os conhecimentos oriundos deste trabalho podem contribuir significativamente para uma melhor compreensão da homeostase do ferro nas plantas e de sua influência no processo fotossintético. Estudos mais aprofundados são necessários para entender a influência do excesso de ferro nas reações de carboxilação, principalmente em relação a atividade das enzimas do ciclo de Calvin. Estes conhecimentos poderão contribuir substancialmente para a biologia de plantas e, conseqüentemente, para a agricultura e nutrição humana, visto que a batata-doce

pode ser usada em programas de melhoramento vegetal visando a obtenção de uma cultivar tolerante ao excesso de ferro no solo.

REFERÊNCIAS

- ADAMSKI, J; COELHO, G. C. Biomass, mineral accumulation, and calcium crystals in *Trema micrantha* (L.) Blume as a function of calcium carbonate addition. **Journal of Plant Nutrition**, v.31, p.205–217, 2008.
- ABADÍA, J.; MORALES, F.; ABADÍA, A. Photosystem II efficiency in low chlorophyll, iron- deficient leaves. **Plant and Soil**, v.215, p.183-192, 1999.
- ALVES, E. S.; TRESMONDI, F; LONGUI, E. L. Análise estrutural de folhas de *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) coletadas em ambientes rural e urbano, SP, Brasil. **Acta bot. bras.**, v.22, n.1, p. 241-248, 2008.
- AMILS, R.; FUENTE, V.; RODRIGUEZ, N.; ZULUAGA, J.; MENENDEZ, N; TORNERO, J. Composition, speciation and distribution of iron minerals in *Imperata cylindrical*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.45, p.335-340, 2007.
- ARMSTRONG, F.A. Why did Nature choose manganese to make oxygen? **Phil Trans. R. Soc. B**, v.363, p.1263-1270, 2008.
- APEL, K.; HIRT, H. Reactive Oxygen Species: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. **Annual Review of Plant Biology**, v.55, p.373-399, 2004.
- APPENROTH, K. J.; STÖCKEL, J.; SRIVASTAVA, A.; STRASSER, R. J. Multiple effects of chromate on the photosynthetic apparatus of *Spirodela polyrhiza* as probed by OJIP chlorophyll a fluorescence measurements. **Environmental Pollution**, v.115, p.49-64, 2001.
- AZEVEDO, R.A., ALAS, R.M., SMITH, R.J., LEA, P.J. Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in the leaves and roots of wild-type and a catalase-deficient mutant of barley. **Physiol. Plant**, v.104, p.280–292, 1998.
- BASER, B.L., SOMANI, L.L. Effect of soil application of manganese on dry matter yield and uptake of manganese and iron by maize. **Am. Edafol. Agrobiol.** v. 41, p. 2211–2220, 1982.
- BOWLER, C; MONTAGU, M. V.; INZÉ, D. Superoxide dismutase and stress tolerance. **Annu. Rev. Plant Physiol.**, v.43, p.83-116, 1992.
- BECANA, M.; MORAN, J.F.; ITURBE-ORMAETXE, I. Iron-dependent oxygen free radical generation in plants subjected to environmental stress: toxicity and antioxidant protection. **Plant and Soil**, v.201, p.137-147, 1998.

- BERTAMINI, M.; MUTHUCHELIAN, K.; NEDUNCHEZHIAN, N. Iron deficiency induced changes on the donor side of PS II in field grown grapevine (*Vitis vinifera* L. cv. Pinot noir) leaves. **Plant Science**, v.162, p.599-605, 2002.
- BRIAT, J. F.; CURIE, C.; GAYMARD, F. Iron utilization and metabolism in plants. **Curr. Opin. Plant Biol**, v.10, p.276–282, 2007.
- BRIAT, J-F; FOBIS-LOISY, I; GRIGNON, N.; LOBRCAUX, S.; PASCAL, N.; SAVINO, J.; THOIRON, S.; WIRÉN, N. VON; WUYTSWINKEL, O. VAN. Cellular and molecular aspects of iron metabolism in plants. **Biol Cell**, v.84, p.69-81, 1995.
- CASSOL, D., SILVA F.S.P., FALQUETO, A.R., BACARIN, M.A. An evaluation of non-destructive methods to estimate total chlorophyll content. **Photosynthetica**, v.46, n.4, p.634-636, 2008.
- CARLI, V. G de. **Avaliações fisiológicas, bioquímicas e histoquímica de *Ipomoea pes-caprae* cultivada em diferentes concentrações de ferro**. 2008. Dissertação (Mestrado de Fisiologia Vegetal), UFV, Viçosa.
- CASTRO, E.M.; PINTO, J.E.B.P.; MELO, H.C.; SOARES, A.M.; ALVARENGA, A.A.; LIMA JÚNIOR, E.C. Aspectos anatômicos e fisiológicos de plantas de guaco submetidas a diferentes fotoperíodos. **Horticultura Brasileira**, v. 23, p.846-850, 2005.
- CHATTERJEE, C.; GOPAL, R.; DUBE, B. K. Impact of iron stress on biomass, yield, metabolism and quality of potato (*Solanum tuberosum* L.). **Scientia Horticulturae**, v.108, p.1-6, 2006.
- CONNOLLY, E. L.; GUERINOT, M. L. Iron stress in plants. **Genome Biology**, v.2, p.1-4, 2002.
- COSTA, P.H.A.DA; NETO, A.D.A.; BEZERRA, M.A.; PRISCO, J.T.; GOMES-FILHO, E. Antioxidant-enzymatic system of two sorghum genotypes differing in salt tolerance. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.17, n.4, p.353-361, 2005.
- CORRÊA, R. M.; PINTO, J. E. B. P; REIS, E. S.; OLIVEIRA, C.; CASTRO, E. M.; BRANT, R. S. Características anatômicas foliares de plantas de orégano (*Origanum vulgare* L.) submetidas a diferentes fontes e níveis de adubação orgânica. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v.31, n.3, p.439-444, 2009.
- CRESTANI, M.; SILVA, J. A. G.; SOUZA, V. Q.; HARTWIG, I.; LUCHE, H. S.; SOUSA, R. O.; CARVALHO, F. I. F.; OLIVEIRA, A. C. Irrigated rice genotype performance under excess iron stress in hydroponic culture. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.9, p.87-95, 2009.
- Del RIO, L. A.; SANDALIO. L. M.; CORPAS, F. J.; LÓPEZ-HUERTAS, E.; PALMA, J. M.; PASTORI, G. M. Activated oxygen-mediated metabolic functions of leaf peroxisomes. **Physiol. Plant.**, v.104, p.673-680, 1998.

DE RONDE, J. A.; CRESS, W. A.; KRUGER, G.H.J. STRASSER, R.J.; VAN STADEN, J. Photosynthetic response of transgenic soybean plants, containing an *Arabidopsis P5CR* gene, during heat and drought stress. **Journal of Plant Physiology**, v.161, p. 1211-1224, 2004.

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

DONNINI, S.; CASTAGNA, A.; RANIERI, A.; ZOCCHI, G. Differential responses in pear and quince genotypes induced by Fe deficiency and bicarbonate. **Journal of Plant Physiology**, v. 166, p.1181-1193, 2009.

DUY, D.; WANNER, G.; MEDA, A. R.; WIRÉN, N. V.; SOLL, J. PHILIPPAR, K. PIC1, an Ancient Permease in *Arabidopsis* Chloroplasts, Mediates Iron Transport. **The Plant Cell**, v.19, p.986-1006, 2007.

EDMOND, J. B.; AMMERMAN, G. R. **Sweet potatoes: production processing marketing**. The Air Publishing, 1971.

FAROOQUI, A.; KULSHRESHTHA, K.; SRIVASTAV, K.; SINGH, S. N.; FAROOQUI, S. A.; PANDEY, V.; AHMAD, K. J. Photosynthesis, stomata1 response and metal accumulation in *Cineraria maritima* L. and *Centaurea moschata* L. grown in metal-rich soil. **The Science of the Total Environment**, v.164, p.203-207, 1995.

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

FOLQUER, F. **La batata (camote): estudio de la planta y su producción comercial**. San José, Costa Rica: Hemisfério Sul, 1978. 134p.

FRIDLAND, L.E.; SCHEIBE, R. Controlled distribution of electrons between acceptors in chloroplasts: a theoretical consideration. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1413, p. 31-42, 1999.

FUKUYAMA, K. Structure and function of plant-type ferredoxins. **Photosynthesis Research**, v.81, p.289-301, 2004.

GALLEGO, S. M.; BENAVIDES, M.P.; TOMARO, M.L. Effect of heavy metal in excess on sunflower leaves: evidence for involvement of oxidative stress. **Plant Science**, 121, p.151-159, 1996.

GALMES, J.; FLEXAS, J.; SAVÉ, R.; MEDRANO, H. Water relations and stomatal characteristics of Mediterranean plants with different growth forms and leaf habits: responses to water stress and recovery. **Plant Soil**, v. 290, p.139-155, 2007.

GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxide dismutases. I. Occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, v.59, p.309-314, 1997.

GLÓRIA, B. A.; GUERREIRO, S. M. C. **Anatomia Vegetal**. 2. ed. atual. Viçosa: UFV, 2006.

HÄNSCH, R.; MENDEL, R. R. Physiological functions of mineral micronutrients (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Mo, B, Cl). **Current Opinion in Plant Biology**, v.12, p.259-266, 2009.

HAUPT-HERTING, S.; FOCK, H.P. Oxygen exchange in relation to carbon assimilation in water-stressed leaves during photosynthesis. **Annals of Botany**, v.89, p.851-859, 2002.

HINTZE, K.J. ; THEIL, E.C. Cellular regulation and molecular interactions of the ferritins. **Cell. Mol. Life Sci.**, v.63, p.591–600, 2006.

HOAGLAND, D.R.; ARNON, D. The water culture method for growing plants without soil. **California Agr. Expt. Sta. Circ.** 347, 1938.

JEONG, J.; CONNOLLY, E. L. Iron uptake mechanisms in plants: Functions of the FRO family of ferric reductases. **Plant Science**, v.176, p.709-714, 2009.

JEONG, J.; GUERINOT, M. L. Homing in on iron homeostasis in plants. **Trends in Plant Science**, v.14, p.280-285, 2009.

JIANRONG, X; QIRAN, T. Early stage toxicity of excess copper to photosystem II of *Chlorella pyrenoidosa*—OJIP chlorophyll *a* fluorescence analysis. **Journal of Environmental Sciences**, v.21, p.1569-1574, 2009.

KAMPFENKEL, K.; VAN, M. M.; INZÉ, D. Effects of iron excess on *Nicotiana plumbaginifolia*. Implications to oxidative stress. **Plant Physiology**, v.107, p.725-735, 1995.

KERKEB, L.; MUKHERJEE, I.; CHATTERJEE, I.; LAHNER, B; SALT, D. E.; CONNOLLY, E. L. Iron-induced turnover of the Arabidopsis IRT1 metal transporter requires lysine residues. **Plant Physiology**, v.146, p.1964–1973, 2008.

KIM, S. A; PUNSHON, T.; LANZIROTTI, A.; LI, L.; ALONSO, J. M.; ECKER, J. R.; KAPLAN, J.; GUERINOT, M. L. Localization of iron in *Arabidopsis* seed requires the vacuolar membrane transporter VIT1. **Science**, v.314, p.1295-1298, 2006.

KRAUS, J. E.; M. ARDUIN. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Seropédica, RJ: EDUR, 1997.

KRAUSE, G.H.; WEIS, E. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, v.42, p.313-349, 1991.

KRISHNAN, S.; DATTA, K.; BAISAKH, N. VASCONCELOS, M.; DATTA, S. K. Tissue-specific localization of *b*-carotene and iron in transgenic indica rice (*Oryza sativa* L.). **Current Science**, v. 84, n.9, 2003.

KRÜEGER, C.; BERKOWITZ, O.; STEPHAN, U.W.; HELL, R. A metal-binding member of the late embryogenesis abundant protein family transports iron in the

phloem of *Ricinus communis* L. **Journal of Biological Chemistry**, v.277, p.25062-25069, 2002.

KUKI, K. N.; OLIVA, M. A.; PEREIRA, E. G.; COSTA, A. C.; CAMBRAIA, J. Effects of simulated deposition of acid mist and iron ore particulate matter on photosynthesis and the generation of oxidative stress in *Schinus terebinthifolius* Radii and *Sophora tomentosa* L. **Science of the Total Environment**, v.403, p.207-214, 2008.

LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Paulo: EPU, 1986.

LI, Y; YANG, G. X.; LUO, L.T.; KE, T.; ZHANG, J.R.; LI, K.X.; HE, G.Y. Aluminium Sensitivity and Tolerance in Model and Elite Wheat Varieties. **Cereal Research Communications**, v.36, n.2, p.257–267, 2008.

LIU, W-J.; ZHU, Y-G.; SMITH, F. A.; SMITH, S. E. Do iron plaque and genotypes affect arsenate uptake and translocation by rice seedlings (*Oryza sativa* L.) grown in solution culture? **Journal of Experimental Botany**, v.55, n.403, p.1707–1713, 2005.

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

LU, C. M.; VONSHAK, A. Photoinhibition in outdoor *Spirulina platensis* cultures assessed by polyphasic chlorophyll fluorescence transients. **Journal of Applied Phycology**, v.11, p.3553-3559, 1999.

MACHADO, A. A.; CONCEIÇÃO, A. R. **WinStat – Sistema de Análise Estatística para Windows versão 1.0**. Universidade Federal de Pelotas, 2007.

MAHMOUDI, H.; KOYRO, H-W.; DEBEZ, A.; ABDELLY, C. Comparison of two chickpea varieties regarding their responses to direct and induced Fe deficiency. **Environmental and Experimental Botany**, v. 66, p.349–356, 2009.

MARANHO, L. T.; GALVÃO, F.; PREUSSLER, K. H.; MUNIZ, G. I. B.; KUNIYOSHI, Y. S. Efeitos da poluição por petróleo na estrutura da folha de *Podocarpus lambertii* Klotzsch ex Endl., Podocarpaceae. **Acta bot. bras.**, v.20, n.3, p.615-624, 2006.

MASSOVER, W.H. Ultrastructure of ferritin and apoferritin: a review. **Micron**, v.24, p. 389-437, 1993.

MELO, H.C.; CASTRO, E. M.; SOARES, A. M.; MELO, L. A.; E ALVES, J. D. Alterações anatômicas e fisiológicas em *Setaria anceps* Stapf ex Massey e *Paspalum paniculatum* L. sob condições de déficit hídrico. **Hoehnea**, v.34, p.145-153, 2007.

MEHLER, A.H. Studies on the reactions of illuminated chloroplasts II - Stimulation on inhibition of the reaction with molecular oxygen. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.34, p.339-351, 1951.

MIRANDA , J. E. C. de; FRANÇA, F. H.; CARRIJO, O. A.; SOUZA, A. F. **Batata-doce**. Brasília: EMBRAPA-CNPQ, 1987. 14p.

- MIRANDA, J. E. C.; FRANÇA, F. H.; CARRIJO, O. A.; SOUZA, A. F.; PEREIRA, W.; LOPES, C. A.; SILVA, J. B. C. **A cultura da batata-doce**. Brasília: EMBRAPA-SPI, (SPI. Coleção Plantar, 30), 1995. 94p.
- MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, London, v.7, p.405-410, 2002.
- MUNEKAGE, Y.; SHINAKAI, T. Cyclic electron transport through photosystem I. **Plant Biotechnology**, v. 22, p.361-69, 2005.
- NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant Cell Physiol**, 22, p.867-880, 1981.
- NENOVA, V. R. Growth and photosynthesis of pea plants under different iron supply. **Acta Physiol Plant**, v.31, p.385-391, 2009.
- NEVES, N. R.; OLIVA, M. A.; CENTENO, D. C.; COSTA, A. C.; RIBAS, R. F.; PEREIRA, E. G. Photosynthesis and oxidative stress in the restinga plant species *Eugenia uniflora* L. exposed to simulated acid rain and iron ore dust deposition: Potential use in environmental risk assessment. **Science of the Total Environment**, v.407, p.3740–3745, 2009.
- OLALEYE, A. O.; OGUNKUNLE, A. O.; SINGH, B. N.; ODELEYE, F. O.; DADA, O. A.; SENJOB, B. A. Elemental Composition of Two Rice Cultivars under Potentially Toxic on Aquept and Aquent. **Not Sci Biol**, v.1, p.46-49, 2009.
- ORIGINLAB. **OriginPro 8.0 SR4**. Northampton: OriginLab, 2008. 1 CD-ROM.
- OUKARROUM, A.; SCHANSKER, G.; STRASSER, R. J. Drought stress effects on photosystem I content and photosystem II thermotolerance analyzed using Chi a I fluorescence kinetics in barley varieties differing in their drought tolerance. **Physiologia Plantarum**, v.137, p.188-199, 2009.
- PELL, E.J.; ECKART, N.; GLICK, R. E. Biochemical and molecular basis for impairment of photosynthesis potential. **Photosynthesis Research**, v.39, p.453-462, 1994.
- PUGH, R. E.; DICK, D. G.; FREDEEN, A. L. Heavy metal (Pb, Zn, Cd, Fe and Cu) contents of plant foliage near the Anvil Range lead/zinc mine, Faro, Yukon Territory. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.52, n.3, p.273-279, 2002.
- RAVET, K.; TOURAINE, B.; BOUCHEREZ, J.; BRIAT, J. F.; GAYMARD, F.; CELLIER, F. Ferritins control interaction between iron homeostasis and oxidative stress in Arabidopsis. **Plant Journal**, v.57, p.400-412, 2009.
- RITSCHHEL, P. S.; HUAMÁN, Z.; LOPES, C. A.; MENEZES, J. E.; TORRES, A. C. **Catálogo de germoplasma de batata-doce**: coleção mantida pela Embrapa Hortaliças. Brasília: Embrapa Hortaliças, 1999. 47p.

ROHÁČEK, K. Chlorophyll fluorescence parameters: the definitions, photosynthetic meaning, and mutual relationships. **Photosynthetica**, v.40, p.13-29, 2002.

ROBELLO, E.; GALATRO, A.; Puntarulo, S. Iron role in oxidative metabolism of soybean axes upon growth effect of iron overload. **Plant Science**, v.172, p.939–947, 2007.

ROSOLEM, C. A.; LEITE, V. M. Coffee leaf and stem anatomy under boron deficiency. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.31, n.3, p.477-483, 2007.

RUZIN, S. E. **Plant microtechnique and microscopy**. Oxford: Oxford University Press. 1999. 322p.

SCHMIDT, W. Iron solutions: acquisition strategies and signaling pathways in plants. **TRENDS in Plant Science**, v.8, p.188-193, 2003.

SHARMA, S. Adaptation of photosynthesis under iron deficiency in maize. **Journal of Plant Physiology**, v.164, p.1261-1267, 2007.

SHIKANAI, T. Cyclic Electron Transport Around Photosystem I: Genetic Approaches. **Annual Review of Plant Biology**, v.58, p.199-217, 2007.

SILVA, L. M.; ALQUINI, Y.; CAVALLET, V. J. Interrelações entre a anatomia vegetal e a produção vegetal. **Acta Botanica Brasilica**, v.19, n.1, p.183-194, 2005.

SILVA, C. L.; OLIVA, M. A.; AZEVEDO, A. A.; ARAÚJO, J. M. D. Responses of restinga plant species to pollution from an iron pelletization factory. **Water, Air, and Soil Pollution**, v.175, p.241-256, 2006.

SILVA, J. B. C.; LOPES, C. A.; MAGALHÃES, J. S. Cultura da batata-doce. In: Cereda, M. C. (Ed). **Agricultura: tuberosas amiláceas latino americanas**. São Paulo: Fundação Cargil, 540 p., 2002.

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**, v.12, p.127-139, 2007.

SINHA, S., GUPTA, M., CHANDRA, P. Oxidative stress induced by iron in *Hydrilla verticillata* Royle: Response of antioxidants. **Ecotoxicol. Environ. Safety**, 38, p.286–291. 1997.

SINHA, S.; SAXENA, R. Effect of iron on lipid peroxidation, and enzymatic and non-enzymatic antioxidants and bacoside-A content in medicinal plant *Bacopa monnieri* L. **Chemosphere**, v.62, p.1340-1350, 2006.

SMITH, W. H.; FRANK, J. R. Comparative biomass yields of energy crops. In: Palz, W.; Coombs, J.; Hall, D. O. (Ed.). Energy from biomass. New York: **Elsevier Applied Science Publishers**, p.323-329, 1984.

SIVAPRAKASH, K.R.; KRISHNAN, S.; SWAPAN, K.; PARIDA, D. A. K. Tissue-specific histochemical localization of iron and ferritin gene expression in transgenic *indica* rice Pusa Basmati (*Oryza sativa* L.). **Journal of Genetics**, n.85, p.157-160, 2006.

SMIRNOFF, N. The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. **New Phytologist**, v.125, n.1, p.27-58, 1993.

SMIT M. F.; HEERDEN, P. D. R.; PIENAAR, J.J.; WEISSFLOG, L.; STRASSER, R. J.; KRIIGER, G. H. J. Effect of trifluoroacetate, a persistent degradation product of fluorinated hydrocarbons, on *Phaseolus vulgaris* and *Zea mays*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.47, p.623-634, 2009.

SOLTI, A.; GÁSPÁR, L.; MÉZÁROS, I.; SZIGETI, Z.; LÉVAI, L.; SÁRVÁRI, E. Impact of Iron Supply on the Kinetics of Recovery of Photosynthesis in Cd-stressed Poplar (*Populus glauca*). **Annals of Botany**, v.102, p.771-782, 2008.

SOUZA-SANTOS, P.; RAMOS, R. S.; FERREIRA, S. T.; CARVALHO-ALVES, P. C.; Iron-induced oxidative damage of corn root plasma membrane H⁺-ATPase. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1512, n.2, p.357-366, 2001.

SRIVASTAVA, A.; GUISSÉ, B.; GREPPIN, H.; STRASSER, R.J. Regulation of antenna structure and electron transport in photosystem II of *Pisum sativum* under elevated temperature probe by fast polyphasic chlorophyll a fluorescence transient: OKJIP. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1320, p.95-106, 1997.

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**, v.154, p.269-277, 2009.

STRASSER, R.J., SRIVASTAVA, A., TSIMILLI-MICHAEL, M. The fluorescence transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples. In: Yunus, M., Pathre, U., Mohanty, P. (eds), Probing photosynthesis: Mechanism, Regulation and Adaptation. Taylor e Francis, London, p.443-480, 2000.

STRASSER, R. J., The grouping model of plant photosynthesis: heterogeneity of photosynthetic units in thylakoids. In: Photosynthesis II, Structure and Molecular Organization of the Photosynthetic Apparatus (Akoyunoglou G, ed.). Philadelphia: Balaban International Science Services, p.727-737, 1981.

STRASSER, R.J., SRIVASTAVA, A., TSIMILLI-MICHAEL, M., Screening the vitality and photosynthetic activity of plants by the fluorescence transient. In: Behl, R.K., Punia, M.S., Lather, B.P.S. (eds), Crop improvement for food security. SSARM, Hisar, India, p.72-115, 1999.

STRASSER, R.J; STIRBET, A.D., Heterogeneity of Photosystem II probed by the numerically simulated chlorophyll a fluorescence rise (O-J-I-P). **Mathematics and Computers in Simulation**, v.48, p.3-9; 1998.

STRASSER, B.J. Donor side capacity of photosystem II probed by chlorophyll a fluorescence transients. **Photosynth. Res.**, v.52, p.147-155, 1997.

STRASSER, B. J.; STRASSER, R. J. Measuring fast fluorescence transients to address environmental questions: The JIP-test. In: Mathis P (ed) *Photosynthesis: From Light to Biosphere*, Vol V, pKluwer Academic Publishers, Dordrecht, p. 977–980, 1995.

STRASSER, R.J.; SRIVASTAVA, A.; TSIMILLI-MICHAEL, M. Analysis of fluorescence transient, in: G. Papageogiou, Govindjee (Eds.), *Chlorophyll Fluorescence: a Signature of Photosynthesis*, **Advances in Photosynthesis and Respiration**, v. 19, Springer, 818 Dordrecht, p.321-362, 2004.

YOKOSHO, K.; YAMAJI, N.; UENO, D.; MITANI, N.; MA, J.F. *OsFRDL1* is a citrate transporter required for efficient translocation of iron rice. **Plant Physiology**, v.149, p. 297-305, 2008.

YUSUF, M. A.; KUMAR, D.; RAJWANSHI, R.; STRASSER, R. J.; TSIMILLI-MICHAEL, M.; GOVINDJEE; SARIN, N. B. Overexpression of γ -tocopherol methyl transferase gene in transgenic *Brassica juncea* plants alleviates abiotic stress: Physiological and chlorophyll a fluorescence measurements. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1797, p.1428-1438, 2010.

YOUSFI, S.; RABHI, M.; ABDELLEY, C.; GHARSALLI, M. Iron deficiency tolerance traits in wild (*Hordeum maritimum*) and cultivated barley (*Hordeum vulgare*). **C. R. Biologies**, v. 332, p.523–533, 2009.

TAKAHASHI M., TERADA Y., NAKAI I., NAKANISHI H., YOSHIMURA E., MORI S., NISHIZAWA N.K. Role of nicotianamine in the intracellular delivery of metals and plant reproductive development. **The Plant Cell**, v.15, p.1263–1280, 2003.

TEDESCO, M.J.; GIANELLO, C.; BISSANI, C.A.; BOHNEN, H. VOLKWEISS, S.J. **Análise do solo, plantas e outros materiais**, 2 ed. Porto Alegre: Departamento de Solos, UFRGS, 1995. 174 p.

TIMPERIO, A. M.; D'AMICI, G. M.; BARTA, C.; LORETO, F.; ZOLLA, L. Proteomic, pigment composition, and organization of thylakoid membranes in iron-deficient spinach leaves. **Journal of Experimental Botany**, v.58, n.13, p.3695-3710, 2007.

TSIMILLI-MICHAEL M., STRASSER R. Mycorrhiza: State of the art, genetic and molecular biology, eco-function, biotechnology, eco-physiology, structure and systematics (Varma A., ed.). 3 ed., **Springer**, p.679–703, 2008.

VAHL, L. C. **Iron toxicity in rice genotypes irrigated by flooding** (In Portuguese with english abstract) PhD. 1991.Thesis. Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

VAROTTO, C.; MAIWALD, D.; PESARESI, P.; JAHNS, P.; SALAMINI, F.; LEISTER, D. The metal ion transporter IRT1 is necessary for iron homeostasis and efficient photosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal**, v.31, n.5, p.589-599, 2002.

ZANANDREA, I.; BACARIN, M. A.; SCHMITZ, D. D.; BRAGA, E. J. B.; PETERS, J. A. Chlorophyll fluorescence *in vitro* cultivated apple. **R. Bras. Agrociência**, v.12, n.3, p. 305-308, 2006.

ZANCANI, M.; PERESSON, C.; BIROCCIO, A.; FEDERICI, G.; URBANI, A.; MURGIA, SOAVE, C.; MICALI, F.; VIANELLO, A.; MACRI, F. Evidence for the presence of ferritin in plant mitochondria. **Eur. J. Biochem.** v. 271, p.3657–3664, 2004.

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