

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS E NATURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL

JOSINEI RODRIGUES FILHO

RESPOSTAS ECOFISIOLÓGICAS DE *Cecropia hololeuca* e *Carica
papaya* AO ESTRESSE POR FERRO

VITÓRIA, ES

2021

JOSINEI RODRIGUES FILHO

RESPOSTAS ECOFISIOLÓGICAS DE *Cecropia hololeuca* e *Carica papaya* AO ESTRESSE POR FERRO

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal do Centro de Ciências Humanas e Naturais da Universidade Federal do Espírito Santo como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutor em Biologia Vegetal.

Área de concentração: Fisiologia Vegetal.

Orientador(a): Prof.^a. Dr.^a Viviana Borges Corte

Coorientador(a): Prof.^a. Dr.^a Idalina Tereza de Almeida Leite Perin

VITÓRIA - ES

2021

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

R696r Rodrigues Filho, Josinei, 1990-
Respostas ecofisiológicas de Cecropia hololeuca e Carica papaya ao estresse por ferro / Josinei Rodrigues Filho. - 2021. 94 f. : il.

Orientadora: Viviana Borges Corte.
Coorientadora: Idalina Tereza de Almeida Leite Perin.
Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) - Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Humanas e Naturais.

1. Mamão. 2. Ecofisiologia Vegetal. 3. Ferro. 4. Matas ripárias. 5. Crescimento (Plantas). 6. Germinação. I. Corte, Viviana Borges. II. Almeida Leite Perin, Idalina Tereza de. III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências Humanas e Naturais. IV. Título.

CDU: 57

Josinei Rodrigues Filho

“Respostas ecofisiológicas de *Cecropia hololeuca* e *Carica papaya* ao estresse por ferro.”

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal do Centro de Ciências Humanas e Naturais, da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Grau de Doutor em Biologia Vegetal.

Aprovada em 23 de agosto de 2021.

Comissão Examinadora:



Prof. Dra. Viviana Borges Corte (UFES)

Orientadora e Presidente da Comissão

Prof. Dra. Idalina Tereza de Almeida Leite Perin (UFES)

Documento assinado digitalmente
gov.br Hildegarde Seibert Franca
Data: 24/08/2021 18:42:27-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Coorientadora



Prof. Dr. Hildegarde Seibert Franca (UFES)

Examinador Interno

Prof. Dr. Elias Terra Werner (UFES)

Examinador Interno

Prof. Dr. Geraldo Rogério Faustini Cuzzuol

Coordenador do PPGBV

Por: Prof. Dr. Jean Carlos Vencioneck Dutra (SEDU/ES)

Examinador Externo

Prof. Dr. Geraldo Rogério Faustini Cuzzuol

Coordenador do PPGBV

Por: Prof. Dr. Frederico Jacob Eutrópio (FAESA)

Examinador Externo



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
PROTOCOLO DE ASSINATURA



O documento acima foi assinado digitalmente com senha eletrônica através do Protocolo Web, conforme Portaria UFES nº 1.269 de 30/08/2018 por VIVIANA BORGES CORTE- SIAPE 2699666 Departamento de Ciências Biológicas - DCB/CCHN Em 24/08/2021 às 15:06

Para verificar as assinaturas e visualizar o documento original acesse o link:
<https://api.lepisma.ufes.br/arquivos-assinados/255442?tipoArquivo=O>



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
PROTOCOLO DE ASSINATURA



O documento acima foi assinado digitalmente com senha eletrônica através do Protocolo Web, conforme Portaria UFES nº 1.269 de 30/08/2018 por IDALINA TEREZA DE ALMEIDA LEITE PERIN- SIAPE 1350356 Departamento de Ciências Biológicas - DCB/CCHN Em 24/08/2021 às 15:58

Para verificar as assinaturas e visualizar o documento original acesse o link:
<https://api.lepisma.ufes.br/arquivos-assinados/255546?tipoArquivo=O>



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
PROTOCOLO DE ASSINATURA



O documento acima foi assinado digitalmente com senha eletrônica através do Protocolo Web, conforme Portaria UFES nº 1.269 de 30/08/2018 por ELIAS TERRA WERNER - SIAPE 2864694 Departamento de Biologia - DB/CCENS Em 24/08/2021 às 18:04

Para verificar as assinaturas e visualizar o documento original acesse o link:
<https://api.lepisma.ufes.br/arquivos-assinados/255702?tipoArquivo=O>



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
PROTOCOLO DE ASSINATURA



O documento acima foi assinado digitalmente com senha eletrônica através do Protocolo Web, conforme Portaria UFES nº 1.269 de 30/08/2018 por GERALDO ROGERIO FAUSTINI CQZZUOL- SIAPE 1173398 Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal - PPGCBV/CCHN Em 25/08/2021 às 09:15

Para verificar as assinaturas e visualizar o documento original acesse o link:
<https://api.lepisma.ufes.br/arquivos-assinados/255897?tipoArquivo=O>

AGRADECIMENTOS

À Deus pela força e direção em todos os momentos. Por ser meu fiel amigo e mostrar sua bondade em cada dia!

À minha querida mãe. Que nunca mediu esforços para que eu conseguisse ingressar, me formar e trilhar os caminhos encontrados na universidade federal. Obrigado mãe! Sem você, nada disso seria possível.

Ao meu amado pai, que mesmo não acompanhando de perto a vida universitária, sempre foi um ombro amigo e fiel companheiro ao longo dos anos!

Ao meu grande amor, Adriana Vasconcellos. Que caminha lado a lado comigo e viu meu sofrimento e minhas lutas. Sempre deu total apoio e, se hoje termino esta tese, devo muito a ela. Seu amor em todos os dias me faz sempre continuar! Essa vitória é nossa!

À minha cunhada Betânia e meus amigos Marcus, Cláudia e Eduardo Baunilha pelas orações e apoio de sempre! Obrigado pelos grandes momentos, alegria e motivação para continuar!

Às minhas orientadoras, Viviana e Idalina. Pelo conhecimento, dedicação e atenção ao longo desses seis anos de pós-graduação. Obrigado por toda a confiança depositada! Foi um período de muito trabalho e empenho, e vocês sempre estiveram comigo e nunca deixaram faltar nada. Serei sempre grato por tudo.

Aos amigos do LASEF: Enes, Mariquito, Bermudes e Flávio. O companheirismo e os grandes momentos com vocês certamente fizeram com que esses anos passassem mais rápido e menos penosos. Vocês são demais, galera diferenciada! Em especial registro aqui meus agradecimentos a dois companheiros e grandes amigos: Rodolpho e Camila. São nas lutas e batalhas que vemos o real sentido da amizade. Obrigado! Vocês dois moram no meu coração.

Ao grande Wanderson “Bico” Keijok que possibilitou a execução de toda a parte de microscopia. Você é fera meu camarada! Agradeço também ao técnico Tadeu por toda a força na hora das análises. Simplesmente nota 10.

Ao meu amigo Fernando Neves que desde 2011, quando pisamos na UFES pela primeira vez como calouros de Biologia, tem sido um grande irmão. Fez com que a convivência ao longo desses anos se tornasse um grande privilégio. Sou sempre grato por sua amizade e pela ajuda nos experimentos e na interpretação.

Aos amigos do NEF: Prof^a Dr^a Diolina, Geovane e Gislane. Obrigado por toda ajuda na parte fotossintética. Agradeço imensamente também ao Prof. Dr Elias pelos valiosos ensinamentos estatísticos, ao Prof. Dr Hildegardo pelo apoio sensacional no IFES, ao Carlitos pela ajuda importantíssima na formulação de soluções e à amiga Juliana pela dedicação e atenção na interpretação de vários dados, e na parte de análises de pigmentos e do estresse oxidativo.

À UFES e ao PPGBV pelo apoio e dedicação na formação de novos pesquisadores ao longo desses quase vinte anos.

À UFV, na pessoa do Prof. Dr Eduardo Borges, por todo o acolhimento e ajuda nas análises enzimáticas. Deixo aqui meu profundo agradecimento ao grande José Mauro “Maurinho” Ferreira! Excepcional profissional, e hoje também amigo, que deu a mim e meus colegas de pós todo o suporte necessário nos experimentos. Foi nosso braço direito, esquerdo e grande contribuidor para o andamento da tese!

À minha querida professora Catarina Bolonha. Foi aquela que na pequena cidade de Santa Teresa, interior do Espírito Santo, a partir do ano de 2001, pôde me mostrar como era fascinante a vida das ciências naturais. Fazia com que uma simples aula de ciências se tornasse algo belo e maravilhoso! Obrigado por despertar em mim o desejo de estudar a vida e todo seu esplendor.

À CAPES pela bolsa concedida, e à banca examinadora pela atenção e disponibilidade.

RESUMO

O ferro é um nutriente essencial para o desenvolvimento vegetal, porém quando em excesso pode acarretar aumento do estresse oxidativo, interferência no metabolismo e danos fisiológicos que culminarão em prejuízos ao crescimento. Tais condições adversas podem hoje ser facilmente encontradas em leitos de rios e regiões próximas a áreas contaminadas pelo acúmulo de Ferro. Assim, o objetivo do presente trabalho foi verificar as possíveis alterações ecofisiológicas na germinação e no crescimento inicial das espécies arbóreas *Carica papaya* e *Cecropia hololeuca* submetidas ao plantio em condições tóxicas de ferro. Ambas as espécies foram submetidas as concentrações de 0.045, 4 e 8mM aplicados na forma de sulfato ferroso e FeEDTA. As sementes foram germinadas em câmara de germinação B.O.D., utilizando-se a temperatura constante de 25 °C e fotoperíodo 12h/12h sendo que as variáveis analisadas foram a porcentagem de germinação (%G), índice de velocidade de germinação, comprimento da parte aérea, comprimento da raiz, massa fresca e massa seca. Para a análise de desenvolvimento inicial as sementes foram semeadas em vasos de polietileno de 0,5L, mantidas em solução de Hoagland a meia força iônica e pH 5,0 e as seguintes variáveis foram analisadas: área foliar, comprimento do caule, comprimento da raiz, massa fresca, massa seca, quantificação de pigmentos cloroplastídeos, análise da fluorescência da clorofila, análise dos teores de elementos via microscopia de varredura e EDS. Foi verificada a atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT, POX para as plântulas jovens. O estresse por ferro afetou o comportamento germinativo de ambas as espécies, com quedas na taxa de germinação, comprimento radicular, massa fresca e seca da raiz e parte aérea. Nas plântulas jovens o aumento dos níveis de ferro trouxe perturbações no teor de pigmentos cloroplastídeos, e na atividade fotossintética, além de prejuízos ao crescimento radicular e aéreo, bem como queda nos valores de área foliar e acúmulo de biomassa. O ferro se mostrou móvel nos tecidos vegetais, e reduziu a absorção de potássio e cálcio nas plântulas estressadas. A aplicação de sulfato ferroso e FeEDTA não causou elevação significativa na atividade das enzimas SOD e CAT. O tratamento com FeEDTA aumentou a concentração de MDA e a atividade da enzima POX. Os danos causados pelo acúmulo de ferro na germinação e desenvolvimento inicial das espécies *Carica papaya* e *Cecropia hololeuca* evidenciam prejuízos ao crescimento e estabelecimento dessas espécies em áreas contaminadas pelo metal.

Palavras-chave: Mamão; Embaúba; Ferro; Mata Ciliar; Crescimento

ABSTRACT

Iron is an essential nutrient for plant development, but when in excess it can lead to increased oxidative stress, interference with metabolism and physiological damage that will culminate in growth losses. Such adverse conditions can now be easily found in river beds and regions near areas contaminated by iron accumulation. Thus, the aim of this study was to verify the possible ecophysiological changes in germination and initial growth of the tree species *Carica papaya* and *Cecropia hololeuca* submitted to planting under toxic iron conditions. Both species were subjected to concentrations of 0.045, 4 and 8mM applied in the form of ferrous sulfate and FeEDTA. The seeds were germinated in a BOD germination chamber, using a constant temperature of 25 °C and a photoperiod of 12h / 12h. The variables analyzed were the germination percentage (% G), germination speed index, length of the aerial part, length of root, fresh mass and dry mass. For the initial development analysis, the seeds were sown in 0.5L polyethylene pots, maintained in Hoagland's solution at half ionic strength and pH 5.0 and the following variables were analyzed: leaf area, stem length, root length, fresh weight, dry weight, quantification of chloroplast pigments, analysis of chlorophyll fluorescence, analysis of element contents via scanning microscopy and EDS. The activity of antioxidant enzymes SOD, CAT, POX was verified for young seedlings. Iron stress affected the germinative behavior of both species, with decreases in the germination rate, root length, fresh and dry mass of the root and shoot. In young seedlings, the increase in iron levels brought fluctuations in the content of chloroplast pigments, and in photosynthetic activity, in addition to damage to root and aerial growth, as well as a drop in leaf area values and biomass accumulation. Iron was mobile in plant tissues and reduced the absorption of potassium and calcium in stressed seedlings. The application of ferrous sulfate and FeEDTA did not cause a significant increase in the activity of the enzymes SOD and CAT. FeEDTA treatment increased MDA concentration and POX enzyme activity. The damages caused by the accumulation of iron in the germination and initial development of the species *Carica papaya* and

Cecropia hololeuca show damage to the growth and establishment of these species in areas contaminated by the metal.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1:

Figura 1: Efeitos do estresse por ferro sobre o RC/ABS, $\delta R_0 = RE_0/ET_0$, PIABS, PITOTAL e $\delta R_0/(1-\delta R_0)$ de plântulas de *C. hololeuca*.....42

Figura 2: Aspecto das plântulas de *C. hololeuca* 10 dias após início do tratamento com ferro.....44

Capítulo 2:

Figura 1: Efeitos do estresse por ferro sobre o RC/ABS e $\delta R_0/(1-\delta R_0)$ de plântulas de *C. papaya*.....63

Figura 2: Efeitos do estresse por ferro sobre o $\delta R_0 = RE_0/ET_0$, PIABS e PITOTAL de plântulas de *C. papaya*.....64

Capítulo 3:

Figura 1: Teores de MDA e H_2O_2 na germinação das sementes de *C. hololeuca* (A e B) e *C. papaya* (C e D) submetidas a elevados teores de Fe. (Teste de Tukey, $p < 0,05$). C: Controle; S4: Sulfato ferroso 4mM; S8: Sulfato ferroso 8mM; E4: FeEDTA 4mM; E8: FeEDTA 8mM.....80

Figura 2: Teores de MDA e H_2O_2 em plantas jovens de *C. hololeuca* (A e B) e *C. papaya* (C e D) submetidas a elevados teores de Fe. O asterisco indica diferença significativa em relação ao controle (Teste de Tukey, $p < 0,05$). C: Controle; S4:

Sulfato ferroso 4mM; S8: Sulfato ferroso 8mM; E4: FeEDTA 4mM; E8: FeEDTA 8mM.....82

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1:

Tabela 1: Efeitos do estresse por ferro na porcentagem de germinação (%G), índice de velocidade de germinação (IVG), crescimento radicular (CR), crescimento da parte aérea (CPA), massa fresca da raiz (MFRaiz), massa fresca da parte aérea (MFPA), massa seca da raiz (MSRaiz) e massa seca da parte aérea (MSPA) de sementes de *C. hololeuca*.....38

Tabela 2: Efeitos do estresse por ferro sobre a atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), Peroxidase Total (POX) e catalase (CAT), em plântulas de *C. hololeuca*.....39

Tabela 3: Efeitos do estresse por ferro sobre as concentrações de clorofilas a, b e carotenóides de plântulas de *C. hololeuca*.....41

Tabela 4: Efeitos do estresse por ferro no crescimento radicular (Raiz), crescimento do caule (Caule), área foliar (AF), massa fresca da raiz (MFR), massa fresca da parte aérea (MFPA), massa seca da raiz (MSR) e massa seca da parte aérea (MSPA) de plântulas de *C. hololeuca*.....44

Capítulo 2:

Tabela 1: Efeitos do estresse por ferro na porcentagem de germinação (%G), índice de velocidade de germinação (IVG), crescimento radicular (CR), crescimento da parte aérea (CPA), massa fresca da raiz (MFRaiz), massa fresca da parte aérea (MFPA), massa seca da raiz (MSRaiz) e massa seca da parte aérea (MSPA) de

sementes	de	C.	
<i>papaya</i>			59
Tabela 2: Efeitos do estresse por ferro sobre a atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), Peroxidase Total (POX) e catalase (CAT), em plântulas de <i>C. papaya</i>61			
Tabela 3: Efeitos do estresse por ferro sobre as concentrações de clorofilas a, b e carotenóides de plântulas de C. <i>papaya</i>62			
Tabela 4: Efeitos do estresse por ferro no crescimento radicular (Raiz), crescimento do caule (Caule), área foliar (AF), massa fresca da raiz (MFR), massa fresca da parte aérea (MFPA), massa seca da raiz (MSR) e massa seca da parte aérea (MSPA) de plântulas de C. <i>papaya</i>66			

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	
GERAL.....	15
2. OBJETIVO	
GERAL.....	16
3. OBJETIVOS	
ESPECÍFICOS.....	16
4. REVISÃO	
BIBLIOGRÁFICA.....	18
4.1 Ocorrência do Ferro e o seu acúmulo no solo.....	18
4.2 Absorção e tolerância das plantas ao Ferro.....	19
4.3 Sensibilidade e sintomas da contaminação por excesso de ferro.....	22
CAPITULO 1 – IRON TOXICITY ON GERMINATION AND EARLY GROWTH OF CECROPIA HOLOLEUCA MIQ.....	32
ABSTRACT.....	32
RESUMO.....	33
1. INTRODUÇÃO.....	34
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
3. RESULTADOS e DISCUSSÃO.....	37
4. CONCLUSÕES.....	46
5. REFERÊNCIAS.....	47
CAPITULO 2 – EFFECTS OF IRON TOXICITY ON GERMINATION AND INITIAL GROWTH OF CARICA PAPAYA L.....	54
ABSTRACT.....	54
RESUMO.....	55
1. INTRODUÇÃO.....	55
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	56
3. RESULTADOS e DISCUSSÃO.....	59
4. CONCLUSÕES.....	68
5. REFERÊNCIAS.....	68
CAPÍTULO 3 - EFEITOS DO FE SOBRE O ESTRESSE OXIDATIVO EM PLANTAS DE C. HOLOLEUCA E C. PAPAYA.....	76

RESUMO.....	76
ABSTRACT.....	76
1. INTRODUÇÃO.....	77
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	79
3. RESULTADOS e DISCUSSÃO.....	80
4. CONCLUSÕES.....	84
5. REFERÊNCIAS.....	84
ANEXOS.....	89

1. INTRODUÇÃO GERAL

A toxicidade por excesso de Ferro é um problema preocupante em solos alagáveis ou em áreas em contato com o minério de ferro e seu beneficiamento (JUCOSKY, 2011). Embora a atividade mineradora represente um dos braços da economia da região sudeste, em especial os estados de Minas Gerais e Espírito Santo, o aumento da mineração e dos resíduos ligados ao processo aumentaram drasticamente nos últimos anos (RIOS, 2017).

Em condições normais no solo, o ferro se apresenta em sua forma insolúvel e oxidada (Fe^{3+}), sendo assim pouco disponível e com baixa absorção pelas plantas. Porém condições anaeróbias e ácidas propiciam um aumento de sua solubilidade, levando-o a apresentar sua forma reduzida (Fe^{2+}), prontamente utilizável pelas plantas e tóxico se em excesso (BECANA et al. 1998; MAGALHAES JR. et al. 2009). Considerado um elemento essencial, o Ferro está envolvido em diversas reações fundamentais para os vegetais, dentre as quais se destacam a respiração, a fotossíntese e reações redox. Além disso, está presente na constituição de muitas proteínas celulares (HELL & STEPHAN, 2003; JUCOSKY, 2011). Todavia, níveis elevados de ferro, em geral maiores que 0.9mM, podem acarretar aumento de espécies reativas de oxigênio e do estresse oxidativo (EL RASAFI, 2016). Outros efeitos pronunciáveis incluem o aumento da peroxidação lipídica e perda da fluidez da membrana, queda na taxa fotossintética, aparecimento de manchas cloróticas nas folhas e queda na taxa de crescimento (BECANA et al. 1998; NEVES et al. 2009; KROHLING et al. 2016).

Os danos ocasionados pela contaminação por Ferro têm despertado profundo interesse ambiental em virtude do fato de tal alteração não apresentar características biodegradáveis, ocasionando permanência nos ciclos biogeoquímicos e afetando não somente a vegetação ciliar próxima à fontes poluidoras, mas também áreas circunvizinhas (COTTA et al., 2006; MARENGONI et al., 2013).

Poucas são as espécies vegetais capazes de tolerar o estresse por ferro (SILVA-OLIVEIRA et al., 2008), além disso a maior parte das plantas que crescem em ambientes ricos em ferro não conseguem evitar a absorção desse elemento, apenas limitá-la (SOARES et al. 2001).

As espécies *Carica papaya* L. (Caricaceae) e *Cecropia hololeuca* Miq. (Cecropiaceae) possuem alta ocorrência nos estados de Espírito Santo e Minas

Gerais (ALVES FERREIRA et al. 2014; CURTINHAS et al. 2015) sendo a primeira um dos pilares econômicos capixabas e nacionais, e a segunda uma espécie pioneira muito presente nas matas ciliares ao longo do Rio Doce e em diversos programas de reflorestamento. Desta forma, representam espécies-chave na compreensão dos possíveis efeitos do aumento da concentração de ferro no meio. Apesar dos recentes avanços no entendimento das respostas ecofisiológicas e metabólicas das plantas (ALTANGEREL et al., 2017; PANDEY et al., 2017), pouco ainda é conhecido em relação a eventuais prejuízos específicos à vegetação causados por excesso de ferro.

Neste contexto, o objetivo do trabalho foi caracterizar as respostas ecofisiológicas das espécies *Carica papaya* e *Cecropia hololeuca* submetidas ao estresse por excesso de ferro.

2. OBJETIVO GERAL

Investigar as alterações ecofisiológicas na germinação e crescimento inicial das espécies *Carica papaya* e *Cecropia Hololeuca* submetidas ao cultivo em condições de toxidez de ferro.

3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a porcentagem de germinação, crescimento foliar e radicular, massa fresca e seca de sementes *C. papaya* e *C. hololeuca* submetidas ao plantio em condições de toxidez de ferro.
- Determinar a atividade de enzimas antioxidantes (Superóxido dismutase, Catalase e Peroxidase) e o teor de peróxido de hidrogênio e malonaldeído em plântulas de *C. papaya* e *C. hololeuca* submetidas ao plantio em condições de toxidez de ferro.
- Analisar o crescimento de mudas de *C. papaya* e *C. hololeuca* submetidas ao plantio em condições de toxidez de ferro.

- Analisar as diferenças nos teores de pigmentos e da atividade fotossintética em mudas de *C. papaya* e *C. hololeuca* submetidas a condições de toxidez de ferro.
- Caracterizar, por meio de microscopia eletrônica de varredura e espectroscopia de energia dispersiva (EDS), raízes e folhas das mudas de *C. papaya* e *C. hololeuca* crescidas em condições de toxidez de ferro e identificar a concentração dos principais elementos em suas partes.

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 Ocorrência do Ferro e o seu acúmulo no solo

Os metais pesados podem ocorrer naturalmente nos solos ou ser de origem antrópica: rejeito industrial, biossólidos e agroquímicos (SARMA, 2011). Porém seu aumento progressivo, relacionado principalmente às atividades humanas, tem se demonstrado um fator preocupante em virtude dos crescentes danos ambientais (ALVES et al. 2008).

Os impactos por acúmulo de ferro tiveram início no século XVII com as atividades mineradoras, mas foi intensificado no início dos séculos XIX e século XX. A atividade industrial aliada ao rápido crescimento populacional contribuiu para um aumento na concentração desse metal, passando a representar um importante fator de contaminação de solos (MUNIZ & OLIVEIRA-FILHO, 2008; WANDERLEY et al. 2016; CANATTO, 2017).

O ferro, quando em contato com o solo, pode acumular e persistir por períodos de tempo relativamente longos. Esse acúmulo pode gerar diversos efeitos fitotóxicos, seja na germinação de sementes ou no estabelecimento de plantas adultas (OLIVEIRA et al. 2005; SILVA et al. 2015). Porém, o fato do metal estar no solo não significa que esteja em forma absorvível pelas plantas, podendo permanecer por longos períodos sem ser assimilado em quantidades tóxicas (SIMONETE & KIEHL, 2002).

Embora seja componente relativamente abundante no solo, o ferro se encontra em grande parte na forma oxidada (Fe^{3+}), sendo pouco solúvel e tendo baixa biodisponibilidade. De acordo com sua solubilidade, o ferro é encontrado em quatro formas principais: dissolvido em soluções do solo; na forma trocável; presente em alguma estrutura de formação do solo e na formação de estruturas insolúveis. Basicamente apenas as duas primeiras formas são passíveis de serem absorvidas pelas plantas (AYDINALP & MARINOVA, 2003; ZENG et al. 2011). Entre os fatores que podem afetar sua disponibilidade, destacam-se o pH e a taxa de oxigênio (BRIAT & LOBRÉAUX, 1997).

Níveis relativamente baixos de acidez facilitam a absorção do ferro nas raízes, uma vez que, baixos valores de pH promovem a passagem do metal oxidado para sua

forma reduzida (Fe^{2+}) ocasionando aumento da solubilidade e disponibilidade direta pela planta (HELL & STEPHAN, 2003; ZHAO et al. 2010). Além disso, níveis altos de acidez conseguem dissolver as estruturas minerais carbonadas que retêm os metais pesados no solo (SIMONETE & KIEHL, 2002). A correlação entre o efeito do pH e a disponibilidade dos metais pesados pelas plantas já está bem documentada na literatura (SUKREEYAPONGSE et al., 2002; BANG & HESTERBERG, 2004), bem como um aumento na mobilidade dos mesmos também foi observada (BADAWY et al., 2002; WANG et al., 2006; DU LAING et al., 2007). O uso indiscriminado de fertilizantes somado ao aumento da poluição atmosférica que resulta em eventos de chuva ácida são dois fatores importantes que contribuem para a acidificação do solo e, assim, favorecer a absorção dos metais pelas plantas (NEVES et al. 2009).

Já a taxa de oxigênio está intimamente relacionada ao processo de inundação do solo (AHLERT, 2010). Em condições aeróbicas, o Ferro se encontra principalmente na forma de óxidos e hidróxidos bastante insolúveis, que não favorecem sua absorção (EPSTEIN & BLOOM, 2005). Entretanto, com o alagamento a água funciona como uma barreira à difusão do oxigênio, tornando o ambiente hipóxico. Somado a isso, o pouco oxigênio dissolvido é consumido por microorganismos aeróbicos, que são em pouco tempo substituídos por anaeróbicos, acarretando aumento na taxa de CO_2 e por conseqüência queda no pH do meio, contribuindo ainda mais para o aumento da disponibilidade do ferro (AHLERT, 2010).

No Brasil, em especial a região Sudeste nos estados de Minas Gerais e Espírito Santo, a problemática do acúmulo de ferro proveniente da atividade mineradora é uma realidade. Solos ciliares e regiões vizinhas ao longo de cursos d'água podem apresentar condições anaeróbicas, gerando um déficit de oxigênio que por sua vez favorece condições de oxirredução. Passando do estado oxidado para o reduzido, os metais pesados (em especial o Fe) apresentam então maior disponibilidade de absorção pelas plantas, o que representa assim um aumento do risco de prejuízos à vegetação (KROHLING et al. 2016).

4.2 Absorção e tolerância das plantas ao Ferro

Nos vegetais o ferro é levado ao meio intracelular de forma ativa ou passiva (CARVER & OWNBY, 1995). Além disso, as plantas desenvolveram diversas

estratégias para absorção do metal. Em dicotiledôneas predomina o mecanismo de acidificação do meio por meio de excreção de prótons através da H⁺ATPase, que por sua vez favorece a redução do ferro para sua forma mais solúvel (Fe²⁺). Essa mesma redução pode ser desencadeada pela enzima FRO2 (Oxidase redutora férrica 2) uma enzima quelato-redutase que vai agir especificamente sobre o (Fe³⁺). O Fe²⁺ é então transportado via plasmalema por meio de canais específicos, em especial o IRT (HELL & STEPHAN, 2003; TRIPATHI et al. 2018). Já em plantas gramíneas o mecanismo mais usado é o de liberação de fitossideróforos (compostos com alta afinidade pelo ferro) que vão agir quelando o Fe³⁺ na raiz, sendo posteriormente assimilado via transportadores específicos do tipo YS1, já bem descrito nas espécies *Zea mays* e *Oryza sativa* (INOUE et al. 2009; JUCOSKY, 2011; CONNORTON et al. 2017; TRIPATHI et al. 2018).

Outras medidas desenvolvidas incluem a modificação da morfologia da raiz com aumento de pêlos radiculares e desenvolvimento de células de transferência, bem como o aumento na concentração de compostos de captação (AHLERT, 2010).

Uma vez dentro dos tecidos o ferro necessita ser complexado para ser translocado de maneira efetiva sem causar danos às células. Um dos complexos mais importantes para este metal é o ferro-nicotinamida (NA) (VERMA & PANDEY, 2017) que percorrerá todo o caminho até o xilema por meio de duas grandes famílias de transportadores intracelulares, YSL e NRAMP, sendo essa última responsável pela passagem de diversos outros compostos como Mn²⁺, Zn²⁺, Cu²⁺, Cd²⁺, Ni²⁺ e Co²⁺ (GROTZ & GUERINOT, 2006; NEVO & NELSON, 2006). Após atravessar todas as membranas e desembocar no xilema o ferro é conjugado com compostos orgânicos em especial o citrato (JUCOSKY, 2011). Ao alcançar a parte aérea, o ferro é retirado do xilema pela ação de proteínas do tipo FRO e novamente conjugado na forma de FeNA antes de atingir as folhas (BASHIR et al. 2016).

Porém, situações de elevação nas concentrações de ferro no meio aliado a mudanças de pH podem representar um acúmulo considerável do metal nos vegetais. O armazenamento se dá então principalmente no vacúolo e no apoplasto sob a forma de hidróxido e sal de fosfato (BRIAT & LEBRUN, 1999). Contudo esse excesso leva possivelmente ao aumento das espécies reativas de oxigênio (ROS) e ao estresse oxidativo.

Durante a evolução, as plantas aprimoraram diversas estratégias para lidarem com a acumulação de metais pesados. Uma mesma planta pode exibir diferentes formas

de lidar com a contaminação, já que as respostas podem variar de acordo com as características de cada espécie, com os metais contaminantes e as condições específicas da área (SOUZA et al. 2011).

Segundo Rodrigues et al. (2016) a tolerância aos metais pesados é alcançada quando uma planta adquire mecanismos de subsistir em ambientes afetados por esses poluentes onde outras plantas não obteriam tal êxito.

Os diversos mecanismos de controle contra a toxidez dos metais podem ser divididos em intra e extracelulares (RODRIGUES et al. 2016).

Dentre os extracelulares destacam-se os exsudados radiculares que atuam modificando o pH do microambiente. Isso desfavorece a solubilidade dos íons com significativa redução na absorção do metal. Além disso, podem atuar complexando os cátions presentes nos metais diminuindo assim sua atividade extracelular e por consequência também sua biodisponibilidade (SOUZA et al. 2011).

Outra estratégia é a associação mutualística entre a planta e fungos micorrízicos (HALL, 2002; MIRZA et al. 2014). Os fungos micorrízicos atuam contribuindo para a redução da disponibilidade dos metais pelas plantas por meio da produção de glicoproteínas, em especial as glomalinas, que possuem alta capacidade de reter metais (DA SILVA et al., 2006). Outro mecanismo que reduz a absorção pela planta pode ser atribuído à retenção e imobilização dos metais na própria estrutura fúngica (ZHU et al. 2001; DE SOUZA et al. 2011).

Já entre os mecanismos intracelulares, ressaltam-se o processo de quelação dos metais, e o transporte e compartimentalização no vacúolo celular (SOUZA et al. 2011).

A quelação envolve agentes de alta afinidade como aminoácidos, ácidos orgânicos e peptídeos como as fitoquelatinas e as metalotioneínas que se ligam aos metais reduzindo sua reatividade no citossol e como resultado, seus efeitos tóxicos (HALL, 2002; DOS SANTOS et al. 2011). Destacam-se ainda o papel das ferritinas na agregação e compartimentalização do Ferro. Ferritinas são proteínas encontradas abundantemente nos plastídeos e mitocôndrias e são capazes de armazenar até 4500 átomos de Ferro em sua cavidade, mantendo-o numa forma não oxidante (ZANCANI et al., 2007).

4.3 Sensibilidade e sintomas da contaminação por excesso de ferro

Por sua natureza química, o excesso de Ferro pode afetar o balanço redox das células, gerando uma diversidade de danos fisiológicos e também morfológicos (BRIAT & LEBRUN, 1999; HELL & STEPHAN, 2003).

Ao entrar em contato com sementes ou raízes de plantas, a membrana plasmática é a primeira estrutura que pode ser afetada pelo ferro (HALL, 2002). Isso pode acarretar mudanças na composição e fluidez da membrana, peroxidação lipídica e possível extravasamento celular (RODRIGUES et al. 2016).

Penetrando a célula, um dos primeiros efeitos causados pelo metal é a sua ligação aos grupos sulfidril das proteínas, causando inativação de enzimas citoplasmáticas, danos à estrutura mitocondrial e inibição de diversas funções celulares, em especial a respiração (GUIMARAES et al. 2008.; RODRIGUES et al. 2016). Arelado a isso, outro efeito tóxico significativo observado junto ao excesso de ferro é a formação e acúmulo de radicais livres e ROS, em especial hidroxila (OH^\cdot), ânion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e Oxigênio singleto ($^1\text{O}_2$) que levam ao estresse oxidativo e resultam em danos severos ao metabolismo celular (RODRIGUES et al. 2016.) Tanto o peróxido de hidrogênio quanto o ânion superóxido podem reagir com o ferro circulante na célula através da reação de Fenton (BECANA et al. 1998; HELL & STEPHAN, 2003). Neste tipo de reação os íons Ferro reagem com as espécies reativas, produzindo ainda mais radicais hidroxilas que por fim aumentam a taxa de oxidação do meio (JUCOSKY, 2011).

As ROS são compostos formados naturalmente durante o metabolismo do vegetal, porém tem seu nível aumentado durante a exposição a metais (SHARMA & DUBEY, 2007). Em concentrações elevadas, os efeitos gerados pelas ROS resultam em alterações em proteínas nucleares, degradação de macromoléculas, danos ao DNA e redução da capacidade antioxidante, em especial dos compostos relacionados à glutathione, importante antioxidante vegetal (DOS SANTOS et al. 2011). Destaca-se também o fato do acúmulo de ferro reduzir os níveis de clorofila e carotenóides por meio de inativação enzimática, além da redução da eficiência quântica do fotossistema II e a taxa de transporte de elétrons, acarretando diversos efeitos prejudiciais ao processo fotossintético e por fim ao crescimento vegetal (SOUZA et al. 2009; DOS SANTOS et al. 2011). O aumento do estresse oxidativo desencadeia então a ativação de ferramentas de defesa eficientes para lidarem com as espécies

reativas. Esses mecanismos podem ser separados em enzimáticos e não enzimáticos (BECANA et al., 1998).

Enzimas como Glutathione-S-Transferase, Peroxidases, Superóxido-dismutase e Catalases atuam de maneira eficaz na redução do processo oxidativo. As superóxido-dismutases (SOD) são uma classe de metaloproteínas encontradas em todos os seres vivos e representam a primeira linha de defesa contra as espécies reativas, causando a dismutação do O_2^- , gerando H_2O_2 e O_2 . Um aumento nos níveis de H_2O_2 , gerados de maneira direta e também indireta através do processo de dismutação, ainda representa um potencial fator oxidante com sua concentração aumentando de maneira proporcional ao acúmulo de ferro, precisando ser eliminado (MCDONALD et al., 2008). Esta etapa é conduzida pela enzima catalase (CAT) em combinação com as peroxidases (POX). A CAT e a POX são duas classes de enzimas diferentes de eliminação de compostos tóxicos devido as suas diferentes afinidades pelo H_2O_2 , com a POX na ordem μM e a CAT em mM. Portanto, enquanto a POX trabalha na modulação mais precisa das ROS, a CAT age em torno da remoção do excesso destes metabólitos gerados durante o estresse (ADAMSKI, 2011). Ambas, Catalases e Peroxidases, são capazes de transformar o H_2O_2 em água e oxigênio molecular, porém as últimas apresentam a capacidade de empregar diferentes compostos doadores de elétrons para a redução do H_2O_2 . Entre os substratos mais eficientes destaca-se o ácido ascórbico (ASADA, 1992).

Já compostos como Tocoferol, Glutathione, Carotenóides, compostos fenólicos e Ubiquinol são os principais exemplos do aparato não enzimático responsável pela defesa do vegetal, atuando de maneira rápida na inibição da reação oxidativa entre radicais orgânicos (PEREIRA, 2006).

5. Referências bibliográficas

ADAMSKI, J. M. **Respostas morfológicas de *Ipomoea batatas* L. em função da concentração de ferro.** Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas. 2011.

AHLERT, R. J. **Análise proteômica diferencial em raízes de plântulas de arroz (*Oriza sativa* L.) submetidas ao estresse por ferro.** Dissertação de mestrado. Ufpel. 2010.

ALTANGEREL, N., ARIUNBOLD, G. O., GORMAN, C., ALKAHTANI, M. H., BORREGO, E. J., BOHLMAYER, D.; SCULLY, M. O. In vivo diagnostics of early abiotic plant stress response via Raman spectroscopy. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 13, p. 3393-3396, 2017.

ALVES, J. C.; SOUZA, A. P.; PÔRTO, M. L. et al. Absorção e distribuição de chumbo em plantas de vetiver, jureminha e algaroba. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.32, n.3, p.1329-1336, 2008.

ALVES FERREIRA, E., GROSSI F. A., PEREIRA, S. C., APARECIDA F. M., BARBOSA S., VALADÃO S. D., APARECIDA, R. G. F. Levantamento fitossociológico de plantas daninhas em pastagens degradadas do Médio Vale do Rio Doce, Minas Gerais. **Ceres**, v. 61, n. 4, 2014.

ASADA, K. Ascorbate peroxidase—a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. **Physiologia Plantarum**, v. 85, n.2, p. 235-241. 1992.

AYDINALP, C. & MARINOVA, S. Distribution and forms of heavy metals in some agricultural soils. *Polish Journal of Environmental Studies* v. 12, 629-633. 2003.

BADAWY, S.H.; HELAL, M.I.D.; CHAUDRI, A.M.; LAWLOR, K.; MCGRATH, S.P. Soil solid-phase controls lead activity in soil solution. **Journal of Environmental Quality** v.31, p.162-167, 2002.

BANG, J. & HESTERBERG, D. Dissolution of trace element contaminants from two coastal plain soils as affected by pH. **Journal of Environmental Quality** v. 33, p. 891-901. 2004.

BASHIR, K.; RASHEED, S.; KOBAYASHI, T.; SEKI, M., & NISHIZAWA, N. K. Regulating subcellular metal homeostasis: the key to crop improvement. **Frontiers in plant science**, v. 7,p.1192. 2016.

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**, n. 201, p. 137-147, 1998.

BRIAT J.F. & LOBRÉAUX, S. Iron transport and storage in plants. **Trends in PlantScience**, v.2 n.5. p.187–193, 1997.

BRIAT, J. F., & LEBRUN, M. Plant responses to metal toxicity. **Comptes Rendus de l'Académie des Sciences-Series III-Sciences de la Vie**, v. 322, n. 1, p. 43-54, 1999.

CANATTO, B. F. **Caracterização geoquímica dos sedimentos da Bacia do Rio Gualaxo do Norte**. Monografia Universidade Federal de Ouro Preto, Departamento de Geologia, 2017.

CARVER, B. F., & OWNBY, J. D. Acid soil tolerance in wheat. **Advances in agronomy**, v. 54, p. 117-173. 1995.

CONNORTON, J. M.; BALK, J., & RODRÍGUEZ-CELMA, J. Iron homeostasis in plants—a brief overview. **Metallomics**, v. 9, n. 7, p. 813-823, 2017.

COTTA, J. A. O.; REZENDE, M. O. O. & PIOVANI, M. R. Avaliação do teor de metais em sedimento do rio betari no parque estadual turístico do alto ribeira-petar, são paulo, Brasil. **Química nova**, v. 29, n. 1, p. 40, 2006.

CURTINHAS, J. N.; DOS SANTOS, J. B.; DE FREITAS VICENTE, N. M. & PEREZ, A. L. Caracterização fitossociológica da vegetação herbácea de áreas alteradas pela atividade agropecuária na região do Médio Vale do Rio Doce, Minas Gerais. **Ceres**, v. 57, n. 3, 2015.

DA SILVA, S.; SIQUEIRA, J. O.; SOARES, C. R. F. S. Fungos micorrízicos no crescimento e na extração de metais pesados pela braquiária em solo contaminado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 12, p. 1749-1757, 2006.

DE SOUZA, L. A.; DE ANDRADE, S. A. L.; DE SOUZA, S. C. R.; SCHIAVINATO, M. A. Tolerância e potencial fitorremediador de *Stizolobium aterrimum* associada ao fungo micorrízico arbuscular *Glomus etunicatum* em solo contaminado por chumbo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 35, n. 1441, 2011.

DOS SANTOS, F. S.; DO AMARAL SOBRINHO, N. M. B.; MAZUR, N. & GARBISU, C. Resposta antioxidante, formação de fitoquelatinas e composição de pigmentos fotoprotetores em *Brachiaria decumbens* Stapf submetida à contaminação com Cd e Zn. **Quim. Nova**, v. 34, n. 1, p. 16-20, 2011.

DU LAING, G.; VANTHUYNE, D.R.J.; VANDECASTEELE, B.; TACK, F.M.G.; VERLOO, M.G. Influence of hydrological regime on pore water metal concentrations in contaminated sediment-derived soil. **Environmental Pollution**, v.147, p. 615-625, 2007.

EPSTEIN, E. & BLOOM, A. J. **Mineral nutrition of plants: principles and perspectives**. 2nd ed. Sunderland: Sinauer Associates, 380 p. 2005.

GROTZ, N. & GUERINOT, M. L. Molecular aspects of Cu, Fe and Zn homeostasis in plants. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1763, p. 595-608, 2006.

GUIMARÃES, M. D. A.; SANTANA, T. A.; SILVA, E. V.; ZENZEN, I. L.; LOUREIRO, M. E. Toxicidade e tolerância ao cádmio em plantas. **Revista Trópica-Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 2, p. 58-68, 2008.

HALL, J. L. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. **Journal of experimental botany**, v. 53, n. 366, p. 1-11, 2002.

HELL, R., & STEPHAN, U. W. Iron uptake, trafficking and homeostasis in plants. **Planta**, v. 216, n. 4, p. 541-551, 2003.

INOUE, H.; KOBAYASHI, T.; NOZOYE, T.; TAKAHASHI, M.; KAKEI, Y.; SUZUKI, K. & NISHIZAWA, N. K. Rice OsYSL15 is an iron-regulated iron (III)-deoxymugineic acid transporter expressed in the roots and is essential for iron uptake in early growth of the seedlings. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n.6, p. 3470-3479, 2009.

JUCOSKI, G. O. **Toxicidade de ferro e metabolismo antioxidativo em *Eugenia uniflora* L.** Universidade Federal de Viçosa. 2011.

KROHLING, C. A.; EUTRÓPIO, F. J.; FIGUEIRA, F. F.; CAMPOSTRINI, E.; DOBBS, L. B. & RAMOS, A. C. Níveis tóxicos de ferro em lavouras de café conilon (*Coffea canephora* L.) em solos de tabuleiros costeiros. **Coffee Science**, v. 11, n.2, p. 255-266, 2016.

MAGALHÃES JR, A. M. de FAGUNDES, P R. R; FRANCO, D. F.; SEVERO, A., FONSECA, G. DE M. DA. Comportamento de linhagens de arroz irrigado da Embrapa à toxidez por ferro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ARROZ IRRIGADO, 6.; 2009, Porto Alegre. Anais... Porto Alegre: Palotti, 2009. P.56-59.

MARENGONI, N. G.; KLOSOWSKI, E. S.; OLIVEIRA, K. P.; CHAMBO, A. P. S. & JUNIOR, A. C. G. Bioacumulação de metais pesados e nutrientes no mexilhão dourado do reservatório da usina hidrelétrica de Itaipu binacional. **Química Nova, São Paulo**, v. 36, n. 3, p. 359-363, 2013.

MCDONALD, I.; SLOAN, G.C.; ZIJLSTRA, A.A.; MATSUNAGA, N.; MATSUURA, M.; KRAEMER, K.E.; MEHRABAN, P.; ZADEH, A.A.; SADEGHIPOUR, H.R. Iron toxicity in rice (*Oryza sativa* L.), under different potassium nutrition, **Asian journal of Plant Sci.** v. 7, p.251-259, 2008.

MIRZA, N.; MAHMOOD, Q.; MAROOF, S.M.; PERVEZ, A.; SULTAN, S. Plants as Useful Vectors to Reduce Environmental Toxic Arsenic Content. **The Scientific World Journal.**, v. 2014, n. 1, 2014.

MUNIZ, D. H., & OLIVEIRA-FILHO, E. C. Metais pesados provenientes de rejeitos de mineração e seus efeitos sobre a saúde e o meio ambiente. **Universitas: Ciências da saúde**, v. 4, n. 1, p. 83-100, 2008.

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.

NEVO, Y. & NELSON, N. The NRAMP family of metal-ion transporters. **Biochim. Biophys. Acta** v. 1763, p. 609–620, 2006.

OLIVEIRA, C. D.; MOURA BRASIL DO AMARAL SOBRINHO, N.; SANTOS MARQUES, V.D.; & MAZUR, N. Efeitos da aplicação do lodo de esgoto enriquecido com cádmio e zinco na cultura do arroz. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 29, n. 1, 2005.

PANDEY, N.; IQBAL, Z.; PANDEY, B. K. & SAWANT, S. V. Phytohormones and Drought Stress: Plant Responses to Transcriptional Regulation. **Mechanism of Plant Hormone Signaling under Stress**, v. 2, p. 477-504, 2017.

PEREIRA, E. G. **Efeitos fisiológicos e bioquímicos causados pela deposição de ferro particulado em *Clusia hilariana*, uma espécie de restinga.** Tese de Doutorado. Tese de mestrado em Fisiologia Vegetal, UFV, 54 pg. 2006.

RIOS, C. O. **Respostas fisiológicas de gramíneas ao déficit hídrico visando a revegetação de pilha de estéril**. Universidade Federal de Viçosa. 2017.

RODRIGUES, A. C. D.; DOS SANTOS, A. M.; DOS SANTOS, F. S.; PEREIRA, A. C. C.; & SOBRINHO, N. M. Mecanismos de respostas das plantas à poluição por metais pesados: possibilidade de uso de macrófitas para remediação de ambientes aquáticos contaminados. **Revista Virtual de Química**, v. 8, n. 1, p. 262-276, 2016.

SARMA, H. Metal hyperaccumulation in plants: a review focusing on phytoremediation technology. **Journal of Environmental Science and Technology**, v. 4, n. 2, p. 118-138, 2011.

SHARMA, P. & DUBEY, R.S. Modulation of nitrate reductase activity in rice seedlings under aluminium toxicity and water stress: role of osmolytes as enzyme protectant. **Journal of Plant Physiology**, v. 162, n. 8, p. 854-864, 2007.

SILVA OLIVEIRA, L.; BONA, C.; DE OLIVEIRA SANTOS, G. & KOEHLER, H. S. Crescimento de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) em solo contaminado com petróleo. **Revista Acta Ambiental Catarinense**, v. 5, n. 1/2, p. 21-33, 2008.

SILVA, M. L. D. S.; VITT, G. C. & TREVIZAM, A. R. Toxicidade por metais pesados em plantas de arroz e soja cultivados em solo contaminado. **Ceres**, v. 61, n. 2, 2015.

SIMONETE, M. A., & KIEHL, J. D. C. Extração e fitodisponibilidade de metais em resposta à adição de lodo de esgoto no solo. **Scientia Agricola**, v. 59, n. 3, p. 555-563, 2002.

SOARES, C. R. F. S.; ACCIOLY, A. M. A.; MARQUES, T. C. M.; SIQUEIRA, J.O. & MOREIRA, F. M. S. Acúmulo e distribuição de metais pesados nas raízes, caule e folhas de mudas de árvores em solo contaminado por rejeitos de indústria de zinco. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 13, n. 3, p. 302-315, 2001.

SOUZA, V. L.; SILVA, D. D. C.; SANTANA, K. B.; MIELKE, M. S.; ALMEIDA, A. F.; MANGABEIRA, P. A. O. & ROCHA, E. A. Efeitos do cádmio na anatomia e na fotossíntese de duas macrófitas aquáticas. **Acta Botanica Brasilica**, v. 23, n. 2, p. 343-354, 2009.

SOUZA, E. P.; DA SILVA, I. D. F. & FERREIRA, L. E. Mecanismos de tolerância a estresses por metais pesados em plantas. **Current Agricultural Science and Technology**, v. 17, n. 2, 2011.

SUKREEYAPONGSE, O.; HOLME, P.E.; STROBEL, B.W.; PANICHSAKPATANA, S.; MAGID, J.; HANSEN, H.C.B. pH-dependent release of cadmium, copper, and lead from natural and sludge-amended soils. **Journal of Environmental Quality** v. 31 p. 1901-1909. 2002.

TRIPATHI, D. K.; SINGH, S.; GAUR, S.; SINGH, S.; YADAV, V.; LIU, S. & DUBEY, N. K. Acquisition and homeostasis of iron in higher plants and their probable role in abiotic stress tolerance. **Frontiers in Environmental Science**, v. 5, p. 86, 2018.

VERMA, L. & PANDEY, N. The Effect of Iron Toxicity on Seed Germination and Early Seedling Growth of Green Gram (*Vigna radiata* L. Wilczek). **International Journal of Science and Research**, v.6, n.8, 2017.

WANDERLEY, L. J.; MANSUR, M. S.; MILANEZ, B. & PINTO, R. G. Desastre da Samarco/Vale/BHP no Vale do Rio Doce: aspectos econômicos, políticos e socio ambientais. **Ciência e Cultura**, v. 68, n. 3, p. 30-35, 2016.

WANG, A.S.; ANGLE, J.S.; CHANEY, R.L.; DELORME, T.A. & REEVES, R.D. Soil pH effects on uptake of Cd and Zn by *Thlaspi caerulescens*. **Plant and Soil**, v. 281, p. 325-337. 2006.

ZANCANI, M.; PERESSON, C.; PATUI, S.; TUBARO, F.; VIANELLO, A.; MACRI, F. Mitochondrial ferritin distribution among plant organs and its involvement in ascorbate-mediated iron uptake and release. **Plant Science**, v.173, p.182-189, 2007.

ZENG, F.; ALI, S.; ZHANG, H.; OUYANG, Y.; QIU, B.; WU, F. & ZHANG, G. The influence of pH and organic matter content in paddy soil on heavy metal availability and their uptake by rice plants. **Environmental pollution**, v. 159, n. 1, p. 84-91, 2011.

ZHAO, K.L.; LIU, X.M.; XU, J.M. & SELIM, H.M. Heavy metal contaminations in a soil-rice system: identification of spatial dependence in relation to soil properties of paddy fields. **Journal of Hazardous Materials**. v. 181, p. 778-787. 2010.

ZHU, Y.; CHRISTIE, P. & LAIDLAW, A. S. Uptake of Zn by arbuscular mycorrhizal white clover from Zn-contaminated soil. **Chemosphere**, v. 42, n. 2, p. 193-199, 2001.

Artigo 1 – Publicado na Revista Ensaios e Ciências. Vol 24, n. especial (2020)**Iron toxicity on germination and early growth of *Cecropia hololeuca* Miq.****Toxicidade por Ferro na germinação e crescimento inicial de *Cecropia hololeuca* Miq.**

Josinei Rodrigues Filho: Universidade Federal do Espírito Santo, Programa de Pós-graduação Stricto Sensu em Biologia vegetal. ES, Brasil. E-mail: josinei.rf@hotmail.com

Viviana Borges Corte: Universidade Federal do Espírito Santo, Programa de Pós-graduação Stricto Sensu em Biologia vegetal. ES, Brasil.

Idalina Tereza de Almeida Leite Perin: Universidade Federal do Espírito Santo, Programa de Pós-graduação Stricto Sensu em Biologia vegetal. ES, Brasil.

Rodolpho Henrique Waichert da Silva: Universidade Federal do Espírito Santo, Programa de Pós-graduação Stricto Sensu em Biologia vegetal. ES, Brasil.

Camila Reis: Universidade Federal do Espírito Santo, Programa de Pós-graduação Stricto Sensu em Biologia vegetal. ES, Brasil.

Abstract

Iron (Fe) is as an essential nutrient for plants and is irreplaceable in many metabolic processes. However, the increase in its concentration leads to the accumulation of reactive oxygen species and oxidative stress that will result in damage to plant. The objective of this work was to verify the effect of high Fe concentrations on germination and initial development of *Cecropia hololeuca* Miq. They were submitted to concentrations of 0.045, 4 and 8mM applied as ferrous sulfate and Fe-EDTA. Germination percentage, germination speed index, shoot length and root, fresh and dry mass were analyzed. For the initial developmental the following variables were analyzed: Leaf area, stem length, root length, fresh and dry mass, chloroplast pigments, chlorophyll fluorescence analysis, analysis of element contents via EDS. The activity of enzymes (SOD, CAT, POX) was verified. Both sources of Fe resulted in damage to germination and development. Fe-EDTA treatment showed the most significant negative effects on germination, root and air growth and seed biomass accumulation. The same treatment was more detrimental in the establishment of young seedlings with decreases in chlorophyll a, root growth, aerial growth, leaf area and biomass accumulation. Seedlings exposed to Fe showed a decrease in

photosynthetic performance and a decrease in leaf calcium (Ca) content. No increase in CAT and SOD enzymes activity was observed. POX increased its activity when submitted to 8mM Fe-EDTA. These results show that the species *C. hololeuca* is sensitive when exposed to toxic levels of Fe, causing damage to metabolism and initial growth.

Keywords: embauba, stress, heavy metal, toxicity.

Resumo

O ferro (Fe) é um nutriente essencial para as plantas, sendo insubstituível ao metabolismo. Todavia, o aumento em sua concentração leva ao acúmulo de espécies reativas de oxigênio e estresse oxidativo que resultará em prejuízos aos vegetais. O objetivo deste trabalho foi verificar o efeito de elevadas concentrações de Fe na germinação e desenvolvimento de *Cecropia hololeuca* Miq. A espécie foi submetida às concentrações de 0.045, 4 e 8mM aplicados na forma de sulfato ferroso e Fe-EDTA. Foram analisadas a porcentagem de germinação, índice de velocidade de germinação, comprimento da parte aérea, radicular, massa fresca e seca. Para a análise de desenvolvimento foi analisado a área folhar o comprimento do caule, comprimento radicular, massa fresca e seca, os pigmentos cloroplastídeos, fluorescência da clorofila, e análise dos teores de elementos via EDS. Foi verificado a atividade enzimática (SOD, CAT, POX). Ambas as fontes de Fe resultaram em danos à germinação e desenvolvimento. O tratamento com Fe-EDTA mostrou efeitos mais significativos na germinação, crescimento aéreo e radicular e biomassa das sementes. O mesmo tratamento se mostrou mais prejudicial nas plântulas jovens com quedas na clorofila a, crescimento radicular, aéreo, área folhar e biomassa. As plântulas expostas ao Fe apresentaram queda no desempenho fotossintético e no teor de cálcio (Ca) folhar. Não foi observado aumento na atividade da CAT e SOD. A POX apresentou elevação quando submetida ao Fe-EDTA 8mM. Tais resultados evidenciam que a espécie *C. hololeuca* se mostra sensível a toxidez por ferro, acarretando danos ao metabolismo e crescimento inicial.

Palavras-chave: embaúba, estresse, metal pesado, toxidez.

1 Introduction

Iron (Fe) is an abundant metal in the soil and classified as an essential nutrient for plants, participating in processes such as respiration, photosynthesis, DNA, and protein synthesis (BECANA *et al.*, 1998; JUCOSKY, 2011). Although abundant, most of the Fe found in the environment is in its oxidized form (Fe^{3+}), which is not well absorbed by plants. However, the increased concentration of Fe, emitted mainly due to the extraction and processing that generates Fe ore dust, combined with conditions of change in pH or flooding, increases the chances of absorption of metals, which will cause various damages to the plant (FAGERIA *et al.*, 1990; JUCOSKY, 2011).

Excess Fe is closely linked to increased production of reactive oxygen species, culminating in the establishment of oxidative stress (NEVES *et al.*, 2009). Also, contact with high levels of Fe causes damage to the photosynthetic apparatus, with possible loss of pigment content, fluctuations in enzymatic metabolism, chlorotic leaf spots, and drop in growth rate (AHLERT, 2010). Another worrying factor is that Fe does not have biodegradable characteristics and remains in the environment for long periods and causing several disturbances to rivers and riparian forests (FELIPPE *et al.*, 2016).

Riparian forests play an important role in soil protection and compaction, as well as in the protection of terrestrial and aquatic fauna (CAMPOS *et al.*, 2008). However, this ecosystem is susceptible to various environmental impacts, whether, of natural origin, such as erosion and sedimentation or of anthropic origin, such as agriculture and mining (BOTREL *et al.*, 2002), the latter was responsible in 2015 for supplying more than 40 million cubic meters of iron-rich tailings that invaded and contaminated the riparian forests along the Rio Doce, Brazil (VIANA; COSTA, 2016).

Floristic and phytosociological studies of the riparian forests of the Rio Doce in the states of Minas Gerais and Espírito Santo indicated a great richness and diversity in the distribution of species (ALVES FERREIRA *et al.*, 2014; CURTINHAS *et al.*, 2015). Among the species studied, *Cecropia hololeuca* Miq. showed abundance and wide distribution in the area studied (ROLIM *et al.*, 2006; CAMPOS *et al.*, 2008; GONÇALVES *et al.*, 2011). *Cecropia hololeuca* Miq. tree is commonly called embaúba and belongs to the Cecropiaceae family. It is a heliophytic species with a height between 6 and 15 meters. It is a fast-growing species, and its fruits are sought by local fauna and is always present in reforestation programs (LORENZI, 2002;

CARVALHO, 2003; IPEF, 2017), thus being a species of considerable ecological importance. It is used in the manufacture of wood products (toys, pencils, phosphorus sticks), in civil construction and as a medicinal plant.

At the expense of advances in understanding the metabolic and ecophysiological responses of plants (ALTANGEREL *et al.*, 2017; PANDEY *et al.*, 2017), there is still little data related to specific damage to riparian vegetation caused by high levels of Fe. This work evaluated the effect of high Fe concentrations on germination and initial development of *C. hololeuca*.

2 Materials and Methods

Seeds of *C. hololeuca* were harvested in 2017, in the city of Rio Doce (MG) (20°15'16.7"S 42°53'15.6"W), and stored in a cold store chamber (5°C, 15% relative humidity) until the beginning of the tests, which were carried out in Laboratory of Seeds and Forest Ecophysiology of the Federal University of Espírito Santo in Vitória, ES.

The treatments were two Fe sources - ferrous sulfate and Fe-EDTA using the concentrations - 4mM and 8mM - plus a control treatment (0.045mM) to evaluate the seed germination and initial seedlings development

We used 100 seeds with four repetitions per treatment, and the data obtained were submitted to analysis of variance (ANOVA) and *a posteriori* Tukey test ($p \leq 0.05$). We performed all statistical analyses using Sisvar program (FERREIRA, 2011).

2.1 Germination Test

The seeds were previously disinfected with a 2% sodium hypochlorite solution for 2 minutes and sown in Petri dishes lined with two sheets of filter paper moistened with the solutions corresponding to each treatment (FERREIRA; BORGUETTI, 2005). We placed the plates in a germination chamber at a constant temperature of 25 °C and a photoperiod of 12h.

The experiment monitoring was daily, considering germinated those seeds showing a radicle protrusion equal to or greater than 2mm (BRASIL, 2009). The trials ended after 14 days. The following parameters were analyzed: germination percentage (%G) and germination velocity index according to (MAGUIRE, 1962),

aerial and radicle length (cm) (FORMAGIO *et al.*, 2010) and fresh and dry mass (ECHER *et al.*, 2009).

2.2 Initial Development Analysis

We sowed *C. hololeuca* seeds in 0.5 L polyethylene pots containing 1:1 unfertilized substrate and washed sand, totalizing twenty seedlings per treatment. After 20 days from germination, we submitted seedlings to the Fe treatments using Fe solutions applied via soil. The experiment was carried out in a growth room at 25° C and a 12 h photoperiod. We kept all the seedlings in the Hoagland solution at half ionic strength and pH 5.0 (HOAGLAND; ARNON, 1950).

2.3 Growth Analysis

The seedlings were evaluated at 10 and 20 days after the start of the treatments, using the following growth measures: leaf area, stem length, root length, fresh and dry mass.

2.4 Extraction and quantification of chloroplastid pigments

We determined the chlorophyll a, b, and carotenoid levels on the 20th day after the beginning of the experiment. We used three repetitions for the analyses, each one with 20 mg of fresh foliar mass homogenized in 5 mL of cold acetone (80%). The material obtained was filtered through a funnel and filter paper, and the filtrate was stored in a 10ml volumetric flask, wrapped in aluminum (Al) foil and PVC. The quantification of the pigments was performed by reading the extract in a spectrophotometer at 470, 645, and 662 nm. We determined concentrations according to Lichtenthaler (1987).

2.5 Chlorophyll fluorescence analysis

We quantified the fluorescence of chlorophyll after 20 days of the experiment. We used fully expanded young leaves from 10 plants per treatment and previously adapted to 40 minutes of darkness by leaf clamps for complete oxidation of the

photosynthetic system. The results obtained were tabulated in spreadsheets using the PEA Plus v1.11 software. From this analysis, the biophysical parameters that quantify the energy flow through the electron transport chain were calculated using the JIP test (STRASSER; STRASSER, 1995).

2.6 Microscopic Scanning and EDS Analysis

At the end of the experiments, seedlings were taken to the drying oven and dehydrated at 70°C for three days. Later they were sectioned into leaf, stem, and root and covered with gold for analysis by scanning electron microscopy and then analyzed by EDS to detect the elements absorbed by their parts (DEDAVID *et al.*, 2007).

2.7 Antioxidant enzyme activities

We verified the activity of the enzymes superoxide dismutase, peroxidase, and catalase in young seedlings at the end of the experiment. We extracted the antioxidant enzymes using 300 mg of vegetable material homogenized with 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 6.8), EDTANa² 0.1 mM, and polyvinylpolypyrrolidone (PVPP) 1% (w/v). Extractions were performed with liquid nitrogen and the homogenized centrifuged at 12000 xg for 15 min at 4°C. We used the supernatant for the superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and peroxidase (POX) activities. We based the superoxide dismutase (SOD) activity on Del Longo *et al.* (1993), conducting the reaction at 25 °C in a 15W light bulb chamber. After 6 minutes of exposure, we did the reading at 560 nm. The peroxidase activity (POX) was measured based on Kar (1976), with reaction at room temperature for 2 minutes followed by reading at 420nm; and the catalase activity (CAT) followed Anderson *et al.* (1995) protocol, performed at room temperature with reading at 240nm for 2 minutes. We used three repetitions with duplicates in an entirely random design (EDS) (PEIXOTO *et al.*, 1999).

3 Results and Discussion

In this study, we verified the effects of high Fe levels on *C. hololeuca* germination and initial growth. The results showed that exposure to this stress caused disturbances in seed metabolism. Although the metal did not affect

germination velocity, it significantly reduced seedling shoot size in the most toxic treatment (8mM EDTA) and germination percentage, root growth, fresh and dry mass in all other treatments. The decrease in dry mass accumulation was 50% in the roots and 83% in the shoots when treated with 8mM Fe-EDTA, compared with the control. In the same 8mM treatment, it was verified an 80% fall in root size and a germination percentage of only 6%, compared to 84% of control seeds (Table 1).

Table 1. Effects of Fe stress on germination percentage (% G), germination speed index (IVG), root growth (CR), shoot growth (CPA), fresh root mass (MFR), fresh mass of shoot (MFPA), dry root mass (MSR) and dry shoot mass (MSPA) of *C. hololeuca* seeds.

Treatment	%G	IVG	CR(cm)	CPA(cm)	MFR(g)	MF PA(g)	MSR(g)	MS PA(g)
Control	84a	1,8a	0,88a	0,33a	0,0029a	0,0039a	0,0008a	0,0018a
Sulfate ²⁺ 4mM	16b	1,5a	0,72b	0,30a	0,0022b	0,0032ab	0,0006b	0,0010ab
Sulfate ²⁺ 8mM	12b	1,17a	0,74b	0,35a	0,0017bc	0,0018abc	0,0004b	0,0005b
EDTA 4mM	14b	1,16a	0,2c	0,25ab	0,0011cd	0,0013bc	0,0004b	0,0005b
EDTA 8mM	6c	1,09a	0,15c	0,17b	0,0009d	0,0007c	0,0004b	0,0003b

Different letters in the same column indicate significant difference between treatments ($p \leq 0.05$, tukey test).

Reductions in germination potential and seedling establishment are closely related to the Fe content applied to the seeds. Although metal is essential to the germination process, even contributing to overcoming plant dormancy according to Murgia and Morandini (2017), Fe above the optimum average concentration for vegetables (0.9mM) is an element that can negatively affect the seed germination reported El Rasafi *et al.* (2016). Working with heavy metal stress, especially Fe, on wheat and bean germination, these authors found that at the concentration of 750 mg L⁻¹ (~ 5mM) of Fe, wheat germination percentage was severely affected. We observed a significant decrease in root and aerial growth when compared to control treatment. Verma and Pandey (2017) studied the germinative behavior of seeds of the genus *Vigna* (Fabaceae). Their results showed that an increase in Fe concentration caused a decrease in germination percentage, as well as in aerial part and root growth, measured through the mass fresh and dry. We verified similar results in this study. Fe can affect the uptake and transport of water necessary for seed imbibition, which causes permanent damage to the embryo, according to Li *et al.* (2005) and Bautista *et al.* (2013). In its reduced and/or chelated form, plants

absorb Fe readily. However, if in excess, it can damage membrane structures, DNA and proteins, due to the accumulation of reactive oxygen species (ROS) as reported by Nagajyoti *et al.* (2010).

In this study, the roots were more sensitive to Fe exposure than the aerial part. Similar results were found by Lingua *et al.* (2008) when working with species of the genus *Phaseolus* (Fabaceae) and *Triticum* (Poaceae). The fact that the root is most affected may be related to plant metabolism itself, as it is the first organ to emerge and thus come into contact with the contaminant. Also, through the deterioration of plant structural components, Fe stress has negative consequences on cell division and cell wall expansion, processes that are most active in primary root growth and seedling emergence (YUSUF *et al.*, 2011). After causing morphophysiological damage, Fe toxicity then leads the plant to, according to Nenova (2006) and Mehraban *et al.* (2008), lose biomass, mainly by depositing in mitochondrial ridges, causing a decrease in respiratory rate and a delay in the development.

C. hololeuca seedlings exposed to toxic Fe levels after germination showed an increase in POX enzyme activity only in the 8mM Fe-EDTA treatment when compared to the control. There was no significant difference in CAT and SOD activity (Table 2).

Table 2. Effects of Fe stress on the activity of the enzymes superoxide dismutase (SOD), Total Peroxidase (POX) and catalase (CAT) in *C. hololeuca* seedlings.

Treatment	SOD (unid. SOD g ⁻¹ MS)	CAT ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}$ MS)	POX ($\mu\text{mol POX min}^{-1} \text{ g}^{-1}$ MS)
Control	2,39a	0,91a	1,50a
Sulfate ²⁺ 4mM	2,36a	1,23a	1,11a
Sulfate ²⁺ 8mM	2,73a	2,74a	1,81a
EDTA 4mM	2,26a	3,14a	1,10a
EDTA 8mM	2,23a	3,47a	3,57b

Different letters in the same column indicate significant difference between treatments ($p \leq 0.05$, tukey test).

Fe is an element known for its pro-oxidative effects through the generation of several ROS and activator of the plant antioxidant system as stated by Stein *et al.* (2009). With the increase of ROS in cells generated by Fe accumulation, the first line of defense of the plant is the increase of SOD activity, an enzyme capable of disputing two superoxide radicals ($O_2^{\cdot-}$) in molecular oxygen and hydrogen peroxide (H_2O_2) (SINHA;SAXENA, 2006). The generated H_2O_2 is also toxic to the cell and must be eliminated. This process is performed by CAT and/or POXs, which act preferentially on peroxisomes and chloroplasts, respectively. Besides, POXs are related to plant growth with direct action on the cell elongation process, by transforming H_2O_2 into OH^- , an important oxidizing agent in lignin formation as reported by Maia *et al.* (2012).

In this study, the CAT and SOD expressions were unchanged, and the POX enzyme had a significant increase only in the 8mM Fe-EDTA treatment. These results differ from several studies showing the positive correlation between Fe stress, increased oxidative stress in plants, and increased antioxidant enzyme activity as it was found in Pereira (2006), Jucosky (2011) and Adamski (2011). The increase in POX expression in response to Fe has been observed by several authors like Carli (2008) (*Ipomea pes-caprae*) (L.) R.Br., Kuki *et al.* (2008) (*Schinus terebinthifolius*) Raddi, and Xing *et al.* 2010 (*Spirodela polyrrhiza*) (L.) Schleid. It's elevation has been linked to a certain degree of metabolic disturbance in chloroplasts, the site of the highest activity of POX enzymes and Fe allocation in the leaves, being the organelle that will most quickly suffer adverse effects under stress (SPEROTTO *et al.*, 2010).

Del Longo (1993) reported that its activity has been concurrent with several other enzymes, especially SOD and CAT. However, we did not verify this in present work, which possibly indicates a non-increase in ROS levels and oxidative stress in *C. hololeuca* seedlings, when subjected to high Fe content. Possibly, the species has its strategies to deal with oxidative damage, which can be neutralized through non-enzymatic antioxidants. This kind of process was already observed in the studies of Pekker *et al.* (2002) and Fourcroy *et al.* (2004), working with *Phaseolus vulgaris* L. and *Arabidopsis* (Brassicaceae) genus, in which treatment with glutathione, an efficient non-enzymatic antioxidant, resulted in reduced gene expression of antioxidant enzymes in seedlings exposed to high levels of Fe.

After analyzing the pigment content, a decrease in the chlorophyll content was observed in all treatments, except Fe²⁺ 4mM, compared to the control. The levels of chlorophyll b and carotenoid did not change (Table 3).

Table 3. Effects of Fe stress on chlorophyll a, b and carotenoid concentrations of *C. hololeuca* seedlings.

Treatment	Chlorophyll a (mg g ⁻¹ MS)	Chlorophyll b (mg g ⁻¹ MS)	Carotenoids (mg g ⁻¹ MS)
Control	4,40 a	2,38a	1,32 a
Sulfate ²⁺ 4mM	5,01a	2,96a	1,35 a
Sulfate ²⁺ 8mM	2,01b	2,33a	1,01 a
EDTA 4mM	2,15b	2,09 a	0,98 a
EDTA 8mM	2,19b	2,89a	1,21a

Different letters in the same column indicate significant difference between treatments ($p \leq 0.05$, tukey test).

We did not observe visible chlorosis on the leaves, but it is known that Fe stress causes a reduction in the concentration of chloroplastic pigments through their binding to several enzymes, which causes their inactivation. Furthermore, Fe can affect the reduction of various compounds in the biosynthesis route of the pigments and has an exceptional power to inhibit protochlorophyllide reductase enzyme, which performs the conversion of protochlorophyll into chlorophyll (CHANDRA; KANG, 2016). In species of Fabaceae and some Poaceae such as rice, the accumulation of Fe caused a decrease in the concentration of chlorophyll and carotenoids which was highlighted by Mehraban *et al.* (2008) and Arunachalam *et al.* (2009). However, the chlorophyll b and carotenoid values of *C. hololeuca* seedlings were not affected by this metal, which shows that, in the species in question, Fe stress may be directed to the main route of light uptake and not to the accessory pigments. Streit *et al.* (2005) found, in the same pathway, that Fe through its binding power to the sulfhydryl group of proteins, can generate damage by inactivating the enzymatic mechanism responsible for the conversion of chlorophyll b (which remained unchanged) into chlorophyll a, namely, the enzyme chlorophyll a oxygenase.

We can also observe that magnesium, one of the essential elements in the formation of the chlorophyll molecule and strongly inhibited in the presence of Fe, according to Zhang *et al.* (2018), has not changed its concentration among the evaluated treatments (Supplementary file), which corroborates the role of Fe as an enzyme inhibitor in chloroplastid pigment biosynthesis. The analysis of the effects of high Fe levels on photosynthetic variables by the JIP test showed that the density of photosynthetic FSII reaction centers (RC/ABS) showed a significant increase only in the treatment with ferrous sulfate when compared to the control (Figure 1). There was no difference between the efficiency with which electrons move from the inter-system receptors to the final FSI receptors ($\delta R0$) or a decrease in the performance of the FSI oxy reduction reactions ($\delta R0 / (1-\delta R0)$) or a deficiency in the FSII. However, the analysis of the total performance index (PITOTAL) shows a decrease in the overall photosynthetic performance of the plant (Figure 1).

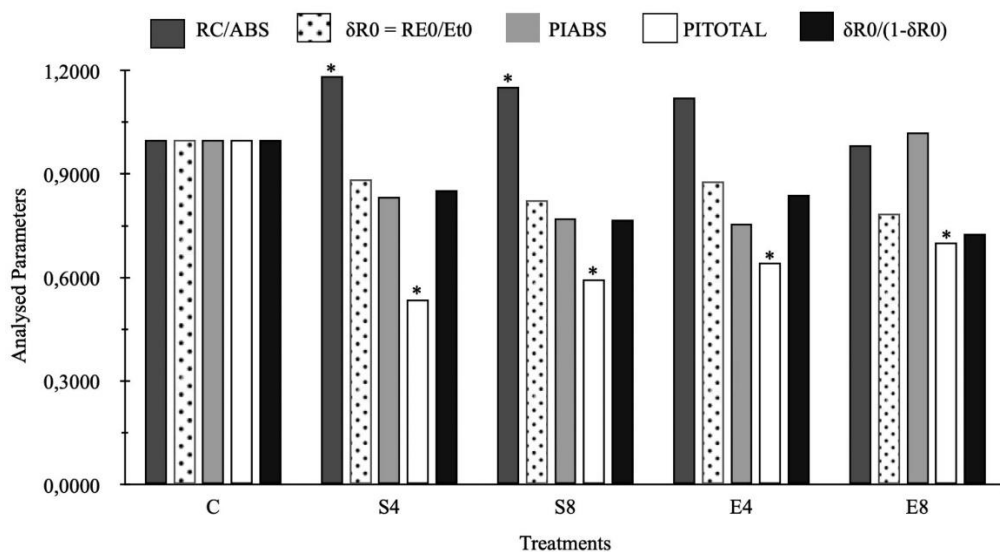


Figure 1. Effects of ferrous stress on RC / ABS, $\delta R0 = RE0 / ET0$, PIABS, PITOTAL and $\delta R0 / (1-\delta R0)$ of *C. hololeuca* seedlings. ©: Control (S4): Fe^{2+} 4mM (S8): Fe^{2+} 8mM (E4): FeEDTA 4mM (E8): FeEDTA 8mM. Asterisk indicates significant difference between mean and control. ($p \leq 0.05$, Tukey test). **Source:** Research data

Fe is the most requested essential micronutrient in plant metabolism, acting as a co-factor in photosystems I and II, in cytochrome b6f and as a structural agent of subunits of the LHC complex. However, Pinto *et al.* (2016) highlights that in excess, it is known to negatively affect photosynthesis. According to Kalaji *et al.* (2017), among

the steps in this process, the most easily affected by stress are those related to FSII due to the ease of D1 protein degeneration. RC/ABS shows the density of active FSII reaction centers, and PIABS represents all FSII activity and is commonly used as an indicator of plant vitality. $\delta R0$ and $\delta R0/(1-\delta R0)$ represent the performance and efficiency of electrons in the oxi-reduction reactions that will culminate in the contribution of electrons to the FSII. The PITOTAL represents the total photosynthesis performance index (PSII + PSI) covering all stages of the electron transport chain and is described as the most sensitive and essential parameter of the analysis (CHEN *et al.*, 2017).

The damage caused by high amounts of Fe has little influence on the efficiency of oxi-reduction reactions of electrons migrating to the FSI conforming to Santos Junior (2018). However, the increase in density of the FSII reaction centers (RC/ABS) in plants treated with ferrous sulfate may indicate an attempt by the plant to increase the absorption and capture of electrons in order to optimize the energy process. Galazzi (2011) and Santos Junior (2018) found similar increases in *Jatropha curcas* L. plants stressed by abiotic factors, especially Fe accumulation. The drop in chlorophyll a and PITOTAL content in both Fe sources, combined with results showing that FSII activity was not affected, probably reflects damage in the FSI. Araújo (2012) found similar results for the species of the genus *Passiflora* (Passifloraceae) exposed to Al and so did Freitas (2018) when working with *Mangifera indica* L., cv. Rosa, exposed to Fe. FSI is more protected from heavy metal damage than other membranous structures, indicating a lower probability of photoinhibition/oxidation than FSII. However, according to Strasser *et al.* (2010) and Tsimilli-Michael and Strasser (2013) the impairment of the FSI is a sign that the photochemical reactions of photosynthesis have been severely affected, which will lead to low final electron assimilation and a drop in the formation of reducing compounds, NADPH₂ and ATP, also bringing damage to the carboxylation phase of photosynthesis with a consequent drop in the sugar rate and growth.

When checking the growth of seedlings submitted to high Fe levels, a visible reduction in both root size and the aerial part was observed already at ten days (Figure 2).



Figure 2. Appearance of *C. hololeuca* seedlings 10 days after starting Fe treatment. (A): Control plant (B): Fe²⁺ 4mM (C): Fe²⁺ 8mM (D): FeEDTA 4mM (E): FeEDTA 8mM.

We observed a reduction in root and stem growth, as well as in leaf area in all treatments, and Fe in its chelated form promoted the most significant damage with significant reductions in practically all variables (Table 4). We observed that treatment with Fe was dose-dependent, causing decreases of 54% in root growth, 46% in stem height, and 80% in leaf area at day 20 in the Fe-EDTA 8mM treatment when compared to control. The production of dry matter from the roots was compromised in the two temporal evaluations (10 and 20 days) for chelated Fe. In the aerial part, the damage was verified only at the end of the experiment for both sources of the contaminant, with Fe in the Fe-EDTA 8mM treatment causing a 75% difference in dry mass after 20 days (Table 4).

Table 4. Effects of Fe stress on root growth (Root), stem growth (Stem), leaf area (AF), fresh root mass (MFR), fresh shoot mass (MFPA), dry root mass (MSR) and shoot dry mass (MSPA) of *C. hololeuca* seedlings.

Treat	Root (cm)		Stem (cm)		AF (cm ²)		MFR (g)	
	10d.	20d.	10d.	20d.	10d.	20d.	10d.	20d.
Control	2,64a	2,89a	1,48a	2,34a	0,65a	1,73a	0,036a	0,047a
Sulfate ²⁺ 4 mM	0,99b	2,11b	1,02b	1,69b	0,42b	0,9b	0,012b	0,016bc
Sulfate ²⁺ 8 mM	1,08b	2,08b	1,15ab	1,70b	0,24bc	0,79b	0,0048b	0,02b
EDTA 4 mM	0,95b	1,65c	1,06b	1,36c	0,26bc	0,43c	0,0088b	0,0090cd
EDTA 8 mM	0,94b	1,33c	1,24ab	1,28c	0,21c	0,35c	0,0063b	0,0063d
	MSR (g)		MFPA (g)		MSPA (g)			

	10d.	20d.	10d.	20d.	10d.	20d.
Control	0,0049a	0,013a	0,031a	0,068a	0,0023a	0,0075a
Sulfate ²⁺ 4 mM	0,0047ab	0,005b	0,010b	0,051b	0,0026a	0,0039b
Sulfate ²⁺ 8 mM	0,0026abc	0,0028c	0,010b	0,040b	0,0030a	0,0038b
EDTA 4 mM	0,0024bc	0,0025c	0,007b	0,020c	0,0022a	0,0026c
EDTA 8 mM	0,0021c	0,0022c	0,0062b	0,016c	0,0018a	0,0019c

Different letters in the same column indicate significant difference between treatments ($p \leq 0.05$, tukey test).

Several studies have highlighted the harmful effect of Fe stress on plant growth. Jucoski (2011) working with the accumulation of different Fe concentrations under the growth of *Eugenia uniflora* L., noticed a great decrease in leaf number, root size, and biomass allocation. Adamski (2011), when submitting *Ipomoea batatas* (L.) Lam plants to concentrations of 4 and 9 mmol of Fe, observed a decrease in the length of branches, leaf area, dry mass, and the number of roots of the specimens. Other results include a decrease in plant height, accompanied by a drop in productivity and ultimately plant death as described by Schmidt *et al.* (2013). We can correlate Fe with the decrease in growth rate, at first, by the damage caused to the biochemical metabolism due to the accumulation of oxidizing substances. However, other pronounced effects include disturbances in nitrogen and carbohydrate metabolism, changes in plasma membrane fluidity with consequent lipid peroxidation, protein inactivation in the membrane itself and damage to the structure of several cytoplasmic organelles, especially the mitochondria, which will culminate in cell overflow (RODRIGUES *et al.*, 2016).

We found, as for the assimilation of elements, that the roots had different concentrations of assimilated Fe. The treatment with Fe²⁺ 4mM was the one that achieved the highest percentage of accumulation (11.91 %), whereas Fe-EDTA 4mM had an accumulation of 5.56%. Also, we observed that, with the increase in Fe concentration of both sources used, there was a decrease in root accumulation, with Fe²⁺ 8mM composing 7.96% of the weight in the root and Fe-EDTA 8mM only 1.18%, indicating a tendency of Fe allocation in the aerial part when it reaches high concentrations (Supplementary File). In plants, the distribution of macro and micronutrients depends basically on transport via xylem and phloem. As studied by

Stein *et al.* (2009) and Morrissey and Guerinot (2009) due to Fe low mobility, it encounters limitations for translocation to the aerial part (about 14%), and roots retain it extensively, with almost 75% of its content linked to the apoplast. Thus, with Fe saturation in the roots, its transport to the leaves would be deficient due to the rapid binding to chelating compounds, mainly ferritin, reducing its activity (DOS SANTOS *et al.*, 2011). However, in this study, there was an increase in Fe transport from the root at concentrations of 8 mM. This result is in agreement with Tripathi *et al.* (2018), who in their study, noticed that in very high concentrations of Fe (8mM), the plant presents the strategy of translocating the metal to the aerial part, especially the young leaves, which would balance the toxicity, not concentrating only on the root, primary target of stress.

Plants treated with Fe in its chelated form showed a 40% reduction in foliar calcium content (Supplementary File). Fe in high doses is known as a potent unbalancing agent of the metabolism of various elements, especially magnesium, phosphorus, potassium, and Ca conforming to Tanaka *et al.* (1966) and Zhang *et al.* (2018). Along the evolutionary course, plants developed several strategies to balance the entrance of Fe in their tissues, avoiding competition with other ions. Following Morrissey and Guerinot (2009), the main mechanisms are related to the modification of the environment around the root epidermis, via acidification of the habitat by releasing protons, which will allow differences in the solubility of the element. Another strategy adopted is morpho-anatomic changes, mainly in leaves and roots by ensuring an adaptation to prevent damage caused by the absorption of high levels of Fe. The element will still be present in the soil, but almost exclusively in its oxidized and not assimilable form. The oxidation of Fe will initiate the formation of Fe plates that can, even if indirectly, harm plant growth. According to Liu *et al.* (2007), because the plate presents physical-chemical characteristics similar to the Fe oxides found in the environment, which can affect the absorption of other elements through adsorption or co-precipitation so that it may explain the decrease in the foliar Ca rate and consequently a decrease in growth. Muller *et al.* (2015) found similar results in other plants when submitted to different forms of Fe.

4 Conclusions

Fe in concentrations of 4mM and 8mM affects the germination process of *C. hololeuca* seeds, generating a drop in the percentage of germination, growth, and

accumulation of biomass. The activity of the enzymes SOD and CAT was not sensitive to Fe toxicity, whereas only POX had its expression increased in *C. hololeuca* seedlings when exposed to 8mM concentration, which does not show significant oxidative stress.

Concentrations of 4mM and 8mM affect the initial development at 10th and 20th days evaluations, with a drop in root and aerial growth, leaf area, and biomass accumulation. Fe can negatively affect the chlorophyll a content, and the photosynthesis of *C. hololeuca* presented significant damage to the PSI, as well as a drop in the general performance of the plant. Fe in high concentrations presents allocation capacity in different parts of the seedling, and in its chelated form, showed interference in Ca metabolism.

References

- ADAMSKI, J. M. Respostas morfológicas de *Ipomoea batatas* L. em função da concentração de ferro. 2011. 64 f. (Dissertação de mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2011.
- AHLERT, R. J. Análise proteômica diferencial em raízes de plântulas de arroz (*Oriza sativa* L.) submetidas ao estresse por ferro. 2010. 82 f. (Dissertação de mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2010.
- ALTANGEREL, N. *et al.* In vivo diagnostics of early abiotic plant stress response via Raman spectroscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 114, n. 13, p. 3393-3396, 2017. doi: 10.1073/pnas.1701328114.
- ALVES FERREIRA, E. *et al.* Levantamento fitossociológico de plantas daninhas em pastagens degradadas do Médio Vale do Rio Doce, Minas Gerais. *Rev. Ceres*, v. 61, n. 4, p. 502-510, 2014. doi: 10.1590/0034-737X201461040008.
- ANDERSON, M. D; PRASAD, T. K.; STEWART, C. R. Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase, and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotyls of maize seedlings. *Plant Physiol*, v.109, p.1247-1257, 1995. doi: 10.1104/pp.109.4.1247.
- ARAUJO, R. A. Estresse por alumínio alterações ecofisiológicas e bioquímicas em variedades do maracujazeiro. 2012. 111 f. (Dissertação de mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2012.

- ARUNACHALAM, R. *et al.* Environmental assessment due to air pollution near iron smelting industry. *J. Environ. Sci. Technol.*, v. 2, p. 179-186, 2009. doi: 10.3923/jest.2009.179.186.
- BAUTISTA, O. V.; FISCHER, G.; CÁRDENAS, J. F. Cadmium and chromium effects on seed germination and root elongation in lettuce, spinach and Swiss chard. *Agron. Colomb*, v. 31, n. 1, p. 48-57, 2013.
- BECANA, M.; MORAN, J. F.; ITURBE-ORMAETXE, I. Iron dependent oxygen freeradical generation in plants subjected to environmental stress: toxicity and antioxidant protection. *Plant Soil*, v. 201, n. 1, p. 137-147, 1998.
- BOTREL, R. T. *et al.* Influência do solo e topografia sobre as variações da composição florística e estrutura da comunidade arbóreo-arbustiva de uma floresta estacional semidecidual em Ingaí, MG. *Rev.Bras.Bot.*, v. 25, p. 195-213, 2002. doi: 10.1590/S0100-84042002000200008.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Regras para análise de sementes*. Brasília: Mapa/ACS, 2009.
- CAMPOS, A. C. A. L. *et al.* Levantamento florístico e fitossociológico da mata ciliar do Rio das Mortes em São João del-Rei, Minas Gerais. *R.Bras.Bioci.*, v. 5, n.2, p. 1177-1179, 2008.
- CARLI, V. G. Avaliações fisiológicas, Bioquímicas e Histoquímica de *Ipomoea pes-caprae* cultivada em diferentes concentrações de ferro. 2008. 53 f. (Dissertação de Mestrado em Botânica) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2008.
- CARVALHO, P. E. R. *Espécies arbóreas brasileiras*. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2003.
- CHANDRA, R.; KANG, H. Mixed heavy metal stress on photosynthesis, transpiration rate, and chlorophyll content in poplar hybrids. *Forest sci technol*, v. 12, n. 2, p. 55-61, 2016. doi: 10.1080/21580103.2015.1044024.
- CHEN, S. *et al.* Classification and characteristics of heat tolerance in *Ageratina adenophora* populations using fast chlorophyll a fluorescence rise OJIP. *Environ Exp Bot.*, v. 122, p. 126-140, 2017. doi: 10.1016/j.envexpbot.2015.09.011.
- CURTINHAS, J. N. *et al.* Caracterização fitossociológica da vegetação herbácea de áreas alteradas pela atividade agropecuária na região do Médio Vale do Rio Doce, Minas Gerais. *Rev. Ceres*, v. 57, n. 3, p. 321-329, 2015. doi: 10.1590/S0034-737X2010000300006.
- DEDAVID, B. A.; GOMES, C. I.; MACHADO, G. *Microscopia eletrônica de varredura: aplicações e preparação de amostras: materiais poliméricos, metálicos e semicondutores*. Porto Alegre: EdiPUCRS, 2007.

DEL LONGO, O. T. *et al.* Antioxidant defenses under hyperoxygenic and hyperosmotic conditions in leaves of two lines of maize with differential to drought. *Plant Cell Physiol.*, v. 37, n. 7, p. 1023-1028, 1993. doi: 10.1093/oxfordjournals.pcp.a078515.

DOS SANTOS, F. S. *et al.* Resposta antioxidante, formação de fitoquelatinas e composição de pigmentos fotoprotetores em *Brachiariadecumbens* Stapf submetida à contaminação com Cd e Zn. *Quim. Nova*, v. 34, n. 1, p. 16-20, 2011. doi: 10.1590/S0100-40422011000100004.

ECHER, F. R.; DOMINATO, J. C.; CRESTE, J. E. Absorção de nutrientes e distribuição da massa fresca e seca entre órgãos de batata-doce. *Hortic. bras.*, v. 27, n. 2, p. 176-182, 2009. doi: 10.1590/S0102-05362009000200010.

EL RASAFI, T. *et al.* The effect of Cd, Zn and Fe on seed germination and early seedling growth of wheat and bean. *Ekológia (Bratisl)*, v. 35, n. 3, p. 213-223, 2016. doi: 10.1515/eko-2016-0017.

FAGERIA, N.K.; BALIGAR, V.C; WRIGHT, R.J. Iron nutrition of plants: an overview on the chemistry and physiology of its deficiency and toxicity. *Pesq. Agropec. Bras.*, v. 25, p.553-570, 1990.

FELIPPE, M. F. *et al.* A tragédia do Rio Doce: A lama, o povo e a água. Relatório de Campo e Interpretações preliminares Sobre as Consequências do Rompimento da Barragem de Rejeitos de Fundão (Samarco/Vale/Bhp). *Revista Geografias*, p. 63-94, 2016. doi: 10.13140/RG.2.1.2677.0960.

FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. *Germinação: do básico ao aplicado*. Porto Alegre: Artmed, 2005.

FERREIRA, D.F. Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciênc. e Agrotec.*, v. 35, n.6, p. 1039-1042, 2011.

FORMAGIO, A. S. N. *et al.* Potencial alelopático de cinco espécies da família Annonaceae. *Rev. Bras.Bioc.*, v. 8, n. 4, p.349-354, 2010.

FOURCROY, P. *et al.* Iron-regulated expression of a cytosolic ascorbate peroxidase encoded by the APX1 gene in Arabidopsis. *Plant Physiol*, v. 134, p. 1-9. 2004. doi: 10.1104/pp.103.029876.

FREITAS, J.F.N. Crescimento inicial e eficiência fotoquímica de mangueiras cultivadas em solo contendo lama do rio doce. 2018. 63 f. (Dissertação de Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2018.

GALAZZI, E.B. Desempenho fotossintético de plantas de *Jatropha curcas* L. cultivadas no estado do Espírito Santo. 2011. 60 f. (Dissertação de Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2011.

GONÇALVES, I. D. S. *et al.* Fatores edáficos e as variações florísticas de um trecho de mata ciliar do Rio Gualaxo do Norte, Mariana, MG. *Rev. Árvore*, v. 35, n. 6, p. 1235-1243, 2011. doi: 10.1590/S0100-67622011000700010.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D.I. The water-culture method for growing plants without soil. *Circular. California agricultural experiment station*, v. 347, n. 2, 1950.

IPEF – Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais. Identificação de espécies florestais. Disponível em: <<https://www.ipef.br/>>. Acesso em: 07 abril 2017.

JUCOSKI, G. O. Toxicidade de ferro e metabolismo antioxidativo em *Eugenia uniflora* L. 2011. 93 f. (Tese de Doutorado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2011.

KALAJI, H.M. *et al.* Chlorophyll a fluorescence as a tool to monitor physiological status of plants under abiotic stress conditions. *Photosynth. Res.*, v. 132, p.13-66, 2017. doi: 10.1007/s11738-016-2113-y.

KAR, M.; MISHRA, D. Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. *Plant Physiol.* v. 57, p. 315-319, 1976. doi: 10.1104/pp.57.2.315.

KUKI, K. N. *et al.* Effects of simulated deposition of acid mist and iron ore particulate matter on photosynthesis and the generation of oxidative stress in *Schinus terebinthifolius* Raddi and *Sophora tomentosa* L. *Sci. Total Environ.*, v. 403, p. 207-214, 2008. doi: 10.1016/j.scitotenv.2008.05.004.

LI, W. *et al.* Effects of heavy metals on seed germination and early seedling growth of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Growth Regul.*, v. 46, p. 45-50, 2005. doi: 10.1007/s10725-005-6324-2.

LINGUA, G. *et al.* Arbuscular mycorrhizal fungi differentially affect the response to high zinc concentrations of two registered poplar clones. *Environ. Pollut.*, v. 153, p. 137-147, 2008. doi: 10.1016/j.envpol.2007.07.012.

LICHTHENTALER, H.K. Chlorophyll and carotenoids-pigments of photosynthetic biomembranes. *Method Enzymol*, v, 148, p. 350-382, 1987. doi: 10.1016/0076-6879(87)48036-1.

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. *Environ Exp Bot*, v.59, p.314-320, 2007. doi: 10.1016/j.envexpbot.2006.04.001.

LORENZI, H. *Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil*. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002.

MAGUIRE J. D. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. *Crop Sci*, v.2, n.1, p.176-177, 1962. doi: 10.2135/cropsci1962.0011183X000200020033x.

MAIA, J. M. *et al.* Atividade de enzimas antioxidantes e inibição do crescimento radicular de feijão caupi sob diferentes níveis de salinidade. *Acta Bot Bras*, v. 26, n. 2, p. 342-349, 2012. doi: 10.1590/S0102-33062012000200010.

MEHRABAN, P.; ZADEH, A. A.; SADEGHIPOUR, H. R. Iron toxicity in rice (*Oryza sativa* L.), under different potassium nutrition, *Asian journal of Plant Sci.*, v. 7, p.251-259, 2008. doi: 10.3923/ajps.2008.251.259.

MORRISSEY, J.; GUERINOT, M. L. Iron uptake and transport in plants: the good, the bad, and the ionome. *Chem. rev.*, v. 109, n. 10, p. 4553-4567, 2009. doi: 10.1021/cr900112r.

MÜLLER, C. *et al.* Differential physiological responses in rice upon exposure to excess distinct iron forms. *Plant Soil*, v. 391, p.123-138,2015. doi: 10.1007/s11104-015-2405-9.

MURGIA, I.; MORANDINI, P. Iron deficiency prolongs seed dormancy in Arabidopsis plants. *Front plant sci*, v. 8, p. 1-5, 2017. doi: 10.3389/fpls.2017.02077.

NAGAJYOTI, P.C.; LEE, K.D.; SREEKANTH T.V.M. Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. *Environ. Chem. Lett.*, v. 8, p. 199-216, 2010. doi: 10.1007/s10311-010-0297-8.

NENOVA, V. Effect of iron supply on growth and photosystem II efficiency of pea plants. *Gen.Appl. Plant Physiol*. v. 32, p. 81-90, 2006.

NEVES, N.R. *et al.* 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. *Sci. Total Environ.*, v. 407, p. 3740-3745, 2009. doi: 10.1016/j.scitotenv.2009.02.035.

PANDEY, N. *et al.* Phytohormones and Drought Stress: Plant Responses to Transcriptional Regulation. *Mechanism of Plant Hormone Signaling under Stress*, v. 2, p. 477-504, 2017. doi: 10.1002/9781118889022.ch34.

PEIXOTO, P.H.P. *et al.* Aluminum effects on lipid peroxidation and on the activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. *Rev. Bras. Fisiol. Veg.*,v. 11, p.137-143, 1999.

PEKKER, I.; TEL-OR, E.; MITTLER, R. Reactive oxygen intermediates and glutathione regulate the expression of cytosolic ascorbate peroxidase during iron-mediated oxidative stress in bean. *Plant Mol. Biol.*, v. 49, p. 429-438, 2002. doi: 10.1023/a:1015554616358.

PEREIRA, E. G. Efeitos fisiológicos e bioquímicos causados pela deposição de ferro particulado em *Clusia hilariana*, uma espécie de restinga. 2006. 66 f. (Dissertação de Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.

PINTO, S. D. S. *et al.* Oxidative damage and photosynthetic impairment in tropical rice cultivars upon exposure to excess iron. *Sci. Agric.*, v. 73, n.3, p. 217-226, 2016. doi: 10.1590/0103-9016-2015-0288.

RODRIGUES, A. C. D. *et al.* Mecanismos de respostas das plantas à poluição por metais pesados: possibilidade de uso de macrófitas para remediação de ambientes aquáticos contaminados. *Rev. Virtual Quim.*, v. 8, n. 1, p. 262-276, 2016. doi: 10.5935/1984-6835.20160017.

ROLIM, S. G. *et al.* Composição florística do estrato arbóreo da floresta estacional semidecidual na planície aluvial do rio Doce, Linhares, ES, Brasil. *Acta Bot. Bras.*, v. 20, n. 3, p. 549-561, 2006. doi: 10.1590/S0102-33062006000300005.

SANTOS JUNIOR, R. N. Fisiologia de Acessos de *Jatropha Curcas* L. Cultivados em Solo Contendo Lama do Rio Doce. 2018. 64 f. (Dissertação de Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2018

SCHMIDT, F. *et al.* Impacto do manejo da água na toxidez por ferro no arroz irrigado por alagamento. *Rev Bras Ciênc Solo*, v. 37, n. 5, p. 1226-1235, 2013. doi: 10.1590/S0100-06832013000500012.

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. doi: 10.1016/j.chemosphere.2005.07.030.

SPEROTTO, R. A. *et al.* Iron stress in plants: dealing with deprivation and overload. *Plant Stress*, v. 4, p.57-69, 2010.

STEIN, R.R.J. *et al.* Distinct physiological responses subjected to iron toxicity under field conditions. *Ann Appl Biol.*, v. 154, p. 269-277, 2009. doi: 10.1111/j.1744-7348.2008.00293.x.

STRASSER, B. J.; STRASSER, R. J. Measuring fast fluorescence transients to address environmental questions: The JIP-test. In: MATHIS, P. (Ed.) *Photosynthesis: from 74 Light to Biosphere.*, Dordrecht:Kluwer Academic Publishers.Netherlands, 1995. p. 977-980.

STRASSER, R. J. *et al.* Simultaneous in vivo recording of prompt and delayed fluorescence and 820 nm reflection changes during drying and after rehydration of the resurrection plant *Haberlea rhodopensis*. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)*, v. 1797, n. 6-7, p. 1313-1326, 2010. doi: 10.1016/j.bbabi.2010.03.008.

STREIT, N. M. *et al.* As clorofilas. *Ciênc. Rural*, v. 35, n. 3, p. 748-755, 2005. doi: 10.1590/S0103-84782005000300043.

TANAKA, A.; LOE, R.; NAVASERO, S. A. Some mechanisms involved in the development of iron toxicity symptoms in the rice plant. *Soil Sci. Plant Nutr*, v.12, p. 32-38, 1966. doi: 10.1080/00380768.1966.10431951.

TRIPATHI, D. K. *et al.* Acquisition and homeostasis of iron in higher plants and their probable role in abiotic stress tolerance. *Front Env Sci Eng*, v. 5, p. 86, 2018. doi: 10.3389/fenvs.2017.00086.

TSIMILLI-MICHAEL, M.; STRASSER, R. J. The energy flux theory 35 years later: formulations and applications. *Photosynth. Res.*, v. 117, p.289- 320, 2013. doi: 10.1007/s11120-013-9895-1.

VERMA, L.; PANDEY, N. The Effect of Iron Toxicity on Seed Germination and Early Seedling Growth of Green Gram (*Vigna radiata* L. Wilczek). *Int. J. Sci. Res.*, v.6, n.8, 2017.

VIANA, J. H. M.; COSTA, A. M. A ciência do solo como instrumento para a recuperação das áreas afetadas pelo desastre de Mariana e dos solos na Bacia do Rio Doce. Embrapa Milho e Sorgo. *Boletim Informativo da Sociedade Brasileira de Ciência do Solo*, v. 42, n. 1, p. 24-27, 2016.

XING, W.; LI, D.; LIU, G. Antioxidative responses of *Elodea nuttallii* (Planch.) H. St. John to short-term iron exposure. *Plant Physiol Biochem*, v. 48, p. 873-878, 2010. doi: 10.1016/j.plaphy.2010.08.006.

YUSUF, M. *et al.* A. Nickel: an overview of uptake, essentiality and toxicity in plants. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, v. 86, p. 1-17, 2011. doi: 10.1007/s00128-010-0171-1.

ZHANG, L. *et al.* Excess iron stress reduces root tip zone growth through nitric oxide-mediated repression of potassium homeostasis in *Arabidopsis*. *New Phytol*, v. 219, n.1, p. 259-274, 2018. doi: 10.1111/nph.15157.

Artigo 2 – Publicado na Revista Scientia Plena. Vol 16, n. 10 (2020)

Effects of iron toxicity on germination and initial growth of *Carica papaya* L.

Efeitos da toxicidade por ferro na germinação e crescimento inicial de *Carica papaya* L.

J. Rodrigues Filho*; V. B. Corte; I. T. A. L. Perin; C. R. dos Santos; R. W. da Silva

Departamento de Ciências Biológicas/Laboratório de Interações Vegetais/Setor Botânica, Universidade Federal do Espírito Santo, 29075-910, Vitória-Espírito Santo, Brasil

josinei.rf@hotmail.com

Iron (Fe) is vital for plant development. Its excessive is harmful, both to forest and cultivated species. This study analyzed the effect of high Fe doses on the germination and initial growth of *Carica papaya* seeds, submitted to concentrations of 0.045, 4, and 8mM in the form of ferrous sulfate and FeEDTA. Germination percentage, germination speed index, shoot and root growth, fresh and dry mass of the seeds were analyzed. For the initial growth the following variables were analyzed: leaf area, stem and root growth, fresh and dry mass, quantification of chloroplastid pigments, analysis of chlorophyll a fluorescence, element contents and the activity of the enzymes Superoxide Dismutase, Catalase and Peroxidase. Fe stress affected the percentage and speed of germination, root growth, and the accumulation of biomass of *C. papaya*, with FeEDTA being responsible for the most pronounced effects. Fe led to increases in chlorophyll and photosynthetic performance without changes in carotenoid levels. The 8mM treatments impaired root growth, aerial growth, leaf area expansion, and biomass accumulation. The increase in Fe concentration led to an increment in its deposition in root tissue, with a drop in potassium levels in the 8mM treatment. There was an increase in Peroxidase activity when submitted to FeEDTA. There was no difference in Superoxide Dismutase and Catalase expression in any treatment. These results show the sensitivity of *C. papaya* species to toxic levels of Fe, which caused damage to metabolism and initial growth.

Keywords: Seed, Metal, Stress

O ferro (Fe) é vital para o desenvolvimento das plantas. Seu excesso é prejudicial para espécies florestais e cultivadas. Este estudo analisou o efeito de altas doses de Fe na germinação e desenvolvimento inicial de *Carica papaya*, submetidas a concentrações de 0.045, 4 e 8mM na forma de sulfato ferroso e FeEDTA. Porcentagem de germinação, índice de velocidade de germinação, comprimento aéreo e radicular e massa fresca e seca das sementes foram analisadas. Para o desenvolvimento inicial as seguintes variáveis foram analisadas: área foliar, comprimento do caule e raiz, massa fresca e seca, quantificação de pigmentos cloroplastídeos, análise da fluorescência da clorofila a, conteúdo dos elementos, e atividade das enzimas Superóxido Dismutase, Catalase e Peroxidase. O estresse por Fe afetou a porcentagem e velocidade de germinação, crescimento radicular e acúmulo de biomassa de *C. papaya*, sendo o FeEDTA responsável pelos efeitos mais pronunciados. O Fe levou a aumentos no teor de clorofila e no desempenho fotossintético sem alterações nos carotenóides. Os tratamentos com 8mM afetaram o crescimento radicular e aéreo, expansão da área foliar e acúmulo de biomassa. O aumento na concentração de Fe acarretou uma maior deposição no tecido radicular, com queda nos níveis de potássio no tratamento 8mM. Houve aumento na atividade da Peroxidase quando submetido ao FeEDTA. Não houve diferença na expressão da Superóxido dismutase e Catalase. Estes resultados mostram a sensibilidade da espécie *C. papaya* ao Fe, causando danos ao metabolismo e desenvolvimento inicial.

Palavras-chave: Semente, Metal, Estresse

1. INTRODUCTION

Mining and processing of Fe are today one of the most important economic activities in southeastern Brazil, especially in the states of Minas Gerais and Espírito Santo [1]. However, the extraction of this mineral generates problems such as the production of non-biodegradable waste which affects both the environment near the extraction and beneficiation area and surrounding regions that may be directly or indirectly linked to production [2].

Toxicity caused by increased Fe concentration is characterized by the accumulation of this metal in all plant tissues, causing foliar chlorotic stains, loss in

photosynthetic efficiency, enzymatic disturbances, a deficit in biomass accumulation, and decrease in growth and fruiting rate in cultivated species [3,4].

Losses caused by the increased Fe content in the productivity of these species is a concern that dates back to the middle of the 20th century when excess Fe was verified in Asia in rice plantations [3]. Other works relating Fe stress to the production of cultivated plants include *Nicotiana tabacum* L. [5], *Lactuca sativa* L. and *Eruca sativa* Mill. [6], *Glycine max* L. Merrill [7] and *Coffea* spp L. [8].

The species *C. papaya* is a tropical fruit tree known by the common name papaya and presents notorious importance in the national economic scenario. The culture occurs in many states of the country, and the city of Linhares, Espírito Santo (Brazil), presents a significant contribution to the national production [9,10], with 60 thousand tons of fruit sold in the country per year [11].

The city of Linhares is cut by watercourses that historically suffer from an accumulation of heavy metals, especially Fe [12,13]. In 2015, Linhares main river suffered with the accumulation of Fe due to the disaster of Mariana, in the state of Minas Gerais. Studies confirmed that more than 40 million cubic meters of Fe-rich waste contaminated the environment, limiting the crop productivity of this species [14].

The study of *C. papaya* as an indicator of environmental quality is essential, not only because it has a wide distribution in areas affected by Fe accumulation [15], but also because it is a widely cultivated, commercialized and consumed species in Brazil. This study analyzed the effects of excess Fe on the germination and initial growth of the species *C. papaya*.

2. MATERIALS AND METHODS

Seeds of *C. papaya*, Sunrise solo variety, were stored in the Plant Interactions Laboratory of the Federal University of Espírito Santo in Vitória (ES) in a cold chamber (5°C). Four treatments (two Fe sources and two concentrations) plus a control treatment, were tested for germination and initial growth. The concentrations used were 0.045 (control), 4mM, and 8mM, applied in the form of ferrous sulfate (FeSO₄), and FeEDTA. The experimental design was entirely randomized, with four repetitions of 25 seeds for the germination test and 20 plants per treatment for the analysis of initial growth. The means obtained from the treatments were compared

using an analysis of variance (ANOVA) and the Tukey test at 5% significance. All statistical analyses used the Sisvar program version 5.7.

Germination Test

Seeds were disinfected with 2% sodium hypochlorite for 2 minutes, washed and sown in Petri dishes. Then, seeds were lined with two sheets of filter paper moistened with FeSO₄ and FeEDTA solutions corresponding to each treatment [16]. The germination tests were run in a B.O.D. germination chamber, under a constant temperature of 25 °C and 12/12h photoperiod. Germination was monitored daily, considering germinated seeds with radicle protrusion of at least 2mm [17]. The germination percentage (%G), germination speed index (GSI) [18], root and aerial part growth (cm) [19] and fresh and dry masses (g) were analyzed [20].

Initial growth analysis

Twenty days old plants, growing in unfertilized substrate plus washed sand in a 1:1 ratio, were submitted to the respective treatments with Fe solutions applied via soil. It was analyzed the antioxidant enzyme activity, chloroplastid pigments, chlorophyll a fluorescence, growth measures and elements content. Plants grew under a constant temperature of 25°C and 12/12h photoperiod and were maintained in Hoagland solution at ionic half strength and pH 5.0 [21].

Antioxidant enzyme activities

The activity of the antioxidant enzymes Superoxide Dismutase (SOD), Peroxidase (POX), and Catalase (CAT) was verified twenty days after the Fe application via soil. For the extraction of the enzymes, 300 mg of root plant material was homogenized with 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 6.8), 0.1 mM EDTANa², and 1% polyvinylpolypyrrolidone (PVPP). The extractions were performed using mortar and pestle with liquid nitrogen. The material was centrifuged at 12000 xg for 15 min at 4°C. The supernatant was used for the SOD, CAT and POX tests. SOD activity was

verified at 25 °C in a 15W lamp-lit chamber, based on Del Longo et al. (1993) [25], Giannopolitis & Ries (1977) [26], and Beauchamp & Fridovich (1971) [27]. After 6 minutes of exposure, a 560nm reading was performed; the measured of POX activity was according to Kar & Mishra (1976) [28] and Chance & Maehley (1955) [29], and the reaction occurred at room temperature for 2 minutes following the 420nm reading, and the CAT activity followed the Havir & Mchale (1987) [30] and Anderson et al. (1995) [31] protocol, and occurred at room temperature with a 240nm reading for 2 minutes. The design used was entirely randomized with three repetitions with duplicates, according to Peixoto et al. (1999) [32].

Extraction and quantification of chloroplastid pigments

The chlorophyll a, b, and carotenoid contents were verified twenty days after the Fe application via soil, using three replicates with 20 mg of fresh foliar mass each, homogenized in 5 ml of icy (80%) acetone. After that, the material was filtered using a funnel and filter paper, and the filtered liquid was then stored in a 10ml volumetric flask wrapped in aluminum foil and PVC. The pigments were quantified using a spectrophotometer (Genesys 10S UV-Vis, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) at wavelengths of 470, 645, and 662 nm. according to Lichtenthaler (1987) [22].

Chlorophyll a fluorescence

Simultaneously with the pigment content, the chlorophyll fluorescence was also quantified using a Handy-PEA (Photosynthetic Efficiency Analyser) Hansatech Instruments®, King's Lynn, Norfolk, UK portable fluorometer. The measurements occurred on expanded young leaves of 10 plants per treatment, and previously adapted to 40 minutes of darkness using leaf clips for complete oxidation of the photosynthetic system. The results were presented in an electronic spreadsheet using the PEA Plus v1.11 software. From this analysis, it was calculated the density of photosynthetic reaction centers of the photosystem II (PSII) (RC/ABS), the efficiency with which electrons move ($\delta R0$), the performance of the photosystem I (PSI) oxy reduction reactions ($\delta R0 / (1-\delta R0)$) and the overall performance of the plant

(PIABS + PITOTAL). All are biophysical parameters that quantify the energy flow through the electron transport chain using the JIP test [23].

Growth measures

The growth of the plants was evaluated at 10 and 20 days after the application of Fe solutions, and the parameters used for the analysis were leaf area (cm²), stem and root growth (cm), and fresh and dry mass (g).

Element content with scanning microscopy

Plants were dehydrated in a drying oven at 70°C for three days. Then, the material was sectioned into leaf, stem, and root, which were then covered with gold for analysis by scanning electron microscopy and then analyzed by Energy Dispersive Spectroscopy (EDS) to detect the elements absorbed by their parts [24].

3. RESULTS AND DISCUSSION

Fe accumulation significantly affected the germination of *C. papaya* species, reducing %G, GSI, root growth, and dry biomass values of germinated seeds. FeEDTA treatment induced the most adverse effects on dry mass accumulation, with a 55% drop in root weight and 42% in airborne weight when compared to control. The same treatment provided an 80% reduction in root growth and a significant delay in GSI, causing seeds to germinate 65% slower than the control. There was no difference in aerial growth between treatments (Table 1).

Table 1: Effects of Fe stress on germination percentage (%G), germination speed index (GSI), root growth (RG), aerial growth (AG), fresh root mass (FRM), fresh aerial mass (FAM), dry root mass (DRM) and dry aerial mass (DAM) of C. papaya seeds.

Treatment	%G	GSI	RG(cm)	AG(cm)	FRM(g)	FAM(g)	DRM(g)	DAM(g)
Control	53a	2,21a	1,86a	1,45ab	0,0078a	0,027a	0,0035a	0,0046a
Fe ²⁺ 4mM	41b	1,73b	1,50a	1,60a	0,0066ab	0,024a	0,0027b	0,0046a

Fe ²⁺ 8mM	40b	1,74b	0,54b	1,16ab	0,0058ab	0,020ab	0,0011c	0,0042a
Fe EDTA 4mM	23c	0,73c	0,38b	0,82b	0,0043b	0,013b	0,0013c	0,0028b
Fe EDTA 8mM	25c	0,78c	0,36b	0,80b	0,0032b	0,013b	0,0016c	0,0027b

Different letters in the same column indicate significant differences between treatments. ($p \leq 0,05$, Tukey test).

Although Fe is essential to plant metabolism and participates in crucial processes such as photosynthesis, respiration and nitrogen fixation [33,34], its excess is harmful as it causes the production of H₂O₂ and other reactive oxygen species (ROS) that will, through oxidative stress, affect almost all cellular functions, including embryonic [35]. The elevation in the oxidation process is highly related to damage to proteins, DNA synthesis, and cell division [36]. Such processes are extremely stimulated after the soaking of seeds and may have been affected by exposure to Fe. The seed is a stage in plant development that presents protection against a wide range of stresses. However, after soaking its sensitivity increases [37] and, in addition to the effects already mentioned, Fe (especially in its chelated version) and other metals can reduce the mitotic activity of the embryonic meristem and present clastogenic effects on chromosomes, as already described in studies involving cultivated species such as corn and sunflower [38,39]. Fe is also able to directly block the transport of water for the soaking of seeds [40,41]. This blockage causes direct damage to germination and germination speed, accumulates dangerously in the mitochondria, and thus harms the respiratory metabolism, which may explain the low accumulation of dry matter in FeEDTA treatments when compared to control [42,43].

C. papaya plants exposed to high doses of Fe showed a significant increase in POX activity in both concentrations of FeEDTA treatment. There was no alteration on the expression of CAT and SOD enzymes (Table 2).

Table 2: Effects of Fe stress on the activity of the enzymes superoxide dismutase (SOD), peroxidase (POX) and catalase (CAT) in *C. papaya* plants.

Treatment	SOD (unity. SOD g ⁻¹ DM)	CAT (μmol H ₂ O ₂ min ⁻¹ g ⁻¹ DM)	POX (μmol POX min ⁻¹ g ⁻¹ DM)
Control	0,40a	29,86a	4,76a
Fe ²⁺ 4mM	0,38a	36,19a	9,13a
Fe ²⁺ 8mM	0,35a	33,22a	7,75a
Fe EDTA 4mM	0,36a	47,42a	19,20b
Fe EDTA 8mM	0,33a	36,41a	13,50b

Different letters in the same column indicate significant differences between treatments. ($p \leq 0,05$, Tukey test).

In response to the accumulation of ROS generated by Fe, the plant's antioxidant mechanisms increase its activity to block possible metabolic damage caused by oxidation [44,45,46]. Among these mechanisms, SOD, CAT, and POX enzymes act in the biotransformation of ROS into less harmful compounds to the plant. SOD is the first defense barrier against ROS, while CAT acts almost exclusively on peroxysomes and plant mitochondria. POX have their sites of action preferentially on chloroplasts and cell walls, where they also contribute to the process of cell expansion via oxidation of phenolic compounds in the last step to the formation of lignin [47,48,49]. In this work, SOD and CAT activities did not differ between treatments, which does not seem to indicate the presence of significant oxidative stress. However, for POX, it was found that FeEDTA caused an increase in enzyme activity. Increases in its activity have already been described for other species of cultivars when stressed with Fe, such as *Solanum tuberosum* L. [50], *Zea mays* L. [51] and *Oryza sativa* L. [52,53]. This fact suggests a certain degree of metabolic disorder in chloroplasts, where there is a higher activity of POXs enzymes and a higher allocation of Fe present in leaves, being, therefore, the organelle that will suffer the most adverse effects when under stress [54].

When analyzing the chloroplastid pigments, no differences were found in carotenoid levels. However, the chlorophyll a concentration increased in all

treatments, and this elevation was up to five times when exposed to FeEDTA 8mM. The chlorophyll b content in the plants varied only when subjected to chelated Fe with a fourteen-fold increase when exposed to 8mM and compared to control (Table 3).

Table 3: Effects of Fe stress on chlorophyll a, b and carotenoid concentrations of *C. papaya* plants.

Treatment	Chlorophyll a (mg g ⁻¹ DM)	Chlorophyll b (mg g ⁻¹ DM)	Carotenoids (mg g ⁻¹ DM)
Control	1,50 a	0,80 a	0,70 a
Fe ²⁺ 4mM	3,38 b	1,30 a	1,07a
Fe ²⁺ 8mM	2,99 b	1,01a	0,78a
Fe EDTA 4mM	4,09 c	2,29b	1,02a
Fe EDTA 8mM	8,1 d	11,37 c	0,82a

Different letters in the same column indicate significant differences between treatments. ($p \leq 0,05$, Tukey test).

Chlorophylls a and b are the main pigments responsible for the capture of light energy that will start the photosynthetic process. It is common to use the concentration of these pigments as an indicator of the effects of several abiotic stresses, including Fe, on plants [55]. Such stresses may inhibit the synthesis of 5-aminolevulinic acid, the precursor molecule of chlorophyll, or increase the activity of the chlorophyllase enzyme, which in turn degrades the chlorophylls present [56]. Also, Fe can block reducing compounds and enzymes that will participate in the pigment biosynthesis route [57]. Nevertheless, in this study, there was a significant increase in chlorophyll levels. Few studies have shown a positive relationship between an increase in heavy metal content and an increase in the amount of chloroplastidic pigments, being restricted basically to green algae [58].

However, Ma et al. (2016) [59], analyzing the effects of different ferrous sulfate concentrations on the growth of *Zea mays* L., found that concentrations up to 500mg/kg (~4mM) stimulated the increase in chlorophyll content. Other similar results showed in individuals of the *Jatropha curcas* L. species grown on a high Fe

substrate and in young plants of *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan and *Moringa oleifera* Lam. in which increased pigment concentrations were observed [60,61,62]. This increase may be related to the investment of the plant in adaptation mechanisms, in which the increase in chlorophyll content can promote a faster recovery of photosynthetic activity when the plant returns to non-stress conditions [63]. Pigment content is closely related to photosynthetic quality, and any change in chlorophyll and carotenoid content can affect photosynthesis and plant productivity [57].

The analysis of the effects of high Fe levels on photosynthetic variables using the JIP test showed that there was no significant difference between the density values of active PSII reaction centers, nor the performance of the oxi-reduction reactions of the PSI (Figure 1). On the other hand, for all treatments, when compared to control, it was observed a significant increase in the locomotion efficiency of electrons and the overall performance of the plant (Figure 2).

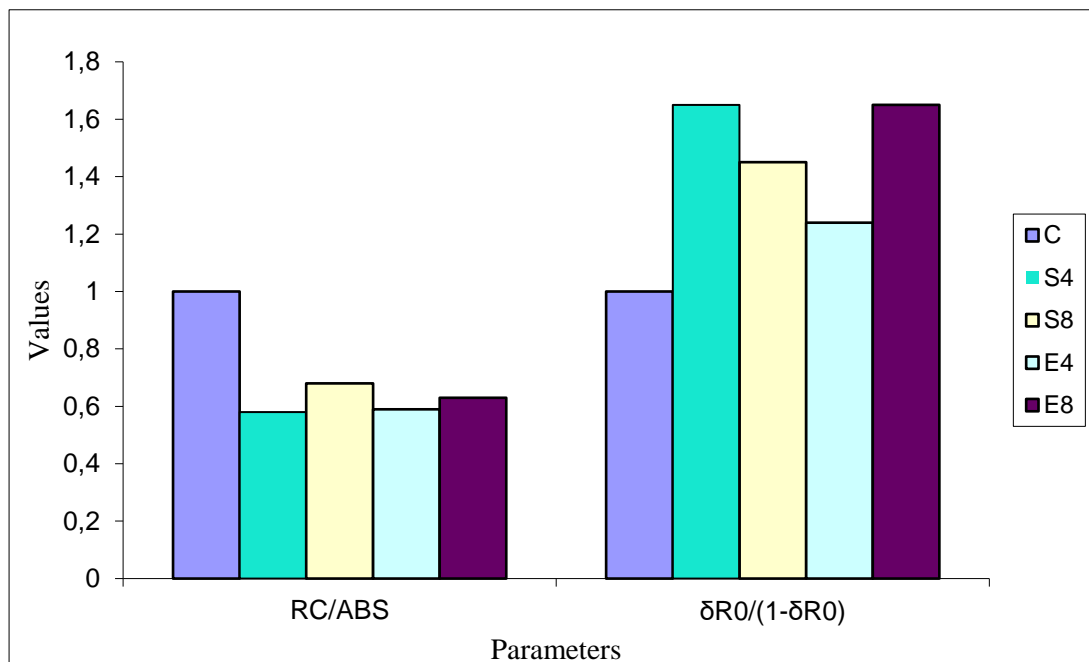


Figure 1: Effects of Fe stress on RC/ABS and $\delta R0/(1-\delta R0)$ of *C. papaya* plants. (C): Control; (S4): Fe^{2+} 4mM; (S8): Fe^{2+} 8mM; (E4): FeEDTA 4mM; (E8): FeEDTA 8mM. ($p \leq 0.05$, Tukey test).

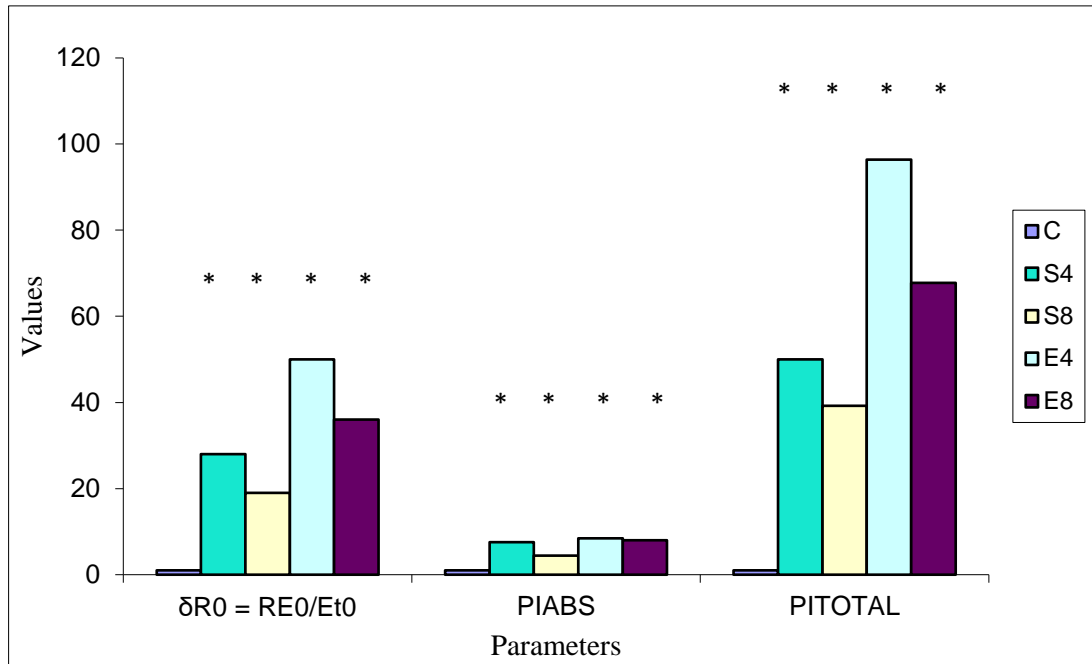


Figure 2: Effects of Fe stress on $\delta R0 = RE0/Et0$, PIABS and PITOTAL of *C. papaya* plants. (C): Control; (S4): Fe^{2+} 4mM; (S8): Fe^{2+} 8mM; (E4): FeEDTA 4mM; (E8): FeEDTA 8mM. Asterisk indicates significant difference between mean and control. ($p \leq 0.05$, Tukey test).

The increase in electron transport and the performance indexes of *C. papaya* plants were in line with the increase in the content of chloroplastid pigments. The increase in chlorophylls a and b concentration allowed a higher light uptake, which resulted in higher performance of both photosystems, without, however, need to raise the density of the reaction centers. Similar increases in electron transport and photosynthetic performance were found by Santos Junior (2018) [62] in his work with *J. curcas* L. plants equally exposed to high Fe contents in the soil during the initial development phase. Such results may indicate a tolerance of *C. papaya* species to Fe stress in their energy transport to the PSI.

Exposure to Fe caused a decrease in root size, aerial part, leaf area, and biomass in both time evaluations, i.e., at 10 and 20 days of the experiment. Fe applied via solution to the soil showed inhibitory effects with both sources of the metal. It was observed near 80% drop in leaf area expansion at ten days compared to the control, on the 8mM concentration of the Fe^{2+} treatment. Similarly, although the same treatment did not provide reductions in root sizes and aerial part at the end of the experiment, it brought significant drops in dry mass accumulation of the aerial part at 10 and 20 days with decreases of 67% and 69% respectively. FeEDTA 8mM treatment showed even more considerable damage, with a 75% reduction in the dry

mass of the aerial part, both at 10 and 20 days. Fe in its chelated form also caused reductions in leaf area measurements and root sizes (for treatment 8mM at 20 days) and aerial part in both time evaluations, when compared to control. Root dry mass values did not change between treatments (Table 4).

Table 4: Effects of Fe stress on root growth (Root), stem growth (Stem), leaf area (LA), fresh root mass (FRM), fresh aerial mass (FAM), dry root mass (DRM) and dry aerial mass (DAM) of *C. papaya* plants at 10 and 20 days after the beginning of treatments.

Treatment	Root (cm)		Stem (cm)		LA (cm ²)		FRM (g)		DRM (g)		FAM (g)		DAM (g)	
	10d.	20d.	10d.	20d.	10d.	20d.	10d.	20d.	10d.	20d.	10d.	20d.	10d.	20d.
Control	2,88a	3,34a	4,62a	4,84a	2,70a	3,17a	0,047a	0,068a	0,0015a	0,0029a	0,147a	0,150a	0,0110a	0,0160a
Fe ²⁺ 4mM	2,36ab	3,26a	3,58b	4,58a	0,85b	2,95ab	0,028ab	0,064a	0,0016a	0,0021a	0,054b	0,130a	0,0041b	0,0130a
Fe ²⁺ 8mM	0,86b	2,38ab	2,90bc	4,52a	0,44c	1,95bc	0,011b	0,036b	0,0014a	0,0023a	0,038b	0,070ab	0,0037b	0,0050b
Fe EDTA 4mM	2,08ab	2,32ab	2,96bc	2,70b	0,64bc	0,96c	0,026b	0,030b	0,0014a	0,0026a	0,046b	0,044b	0,0030b	0,0054b
Fe EDTA 8mM	2,26ab	1,96b	2,52c	2,68b	0,55c	1,03c	0,018b	0,031b	0,0010a	0,0023a	0,040b	0,034b	0,0026b	0,0041b

Different letters in the same column indicate significant differences between treatments. ($p \leq 0,05$, Tukey test).

It was verified the deleterious effects of Fe on plants growth from the concentration of 4mM for the chelated form, and of 8mM for the ferrous sulfate. Other studies found similar damage caused by Fe excess in plant development. *Eugenia uniflora* L. plants exposed to high Fe concentrations showed a decrease in root growth, plant height, as well as accumulation of dry matter [46]. Neves (2004) [64], also working with *E. uniflora* L., observed a significant decrease in branches and leaves numbers, stem and roots growth, and root volume of plants subjected to stress by ferric citrate. In cultivated species, the same effects on growth were verified in *Oryza sativa* L., *Ipomoea batatas* (L.) Lam., and *Vigna radiata* (L.) R. Wilczek [3,47,34]. The toxic effects of Fe may be related to its efficiency in inactivating several key enzymes of plant metabolism, which will culminate in blocking protein and DNA synthesis, as well as causing nutritional disorders [65,66]. Additionally, Fe can act by reducing the availability of the reducing power of NADPH₂ and ATP or causing an imbalance in the enzymes involved in fixing atmospheric CO₂ in the Calvin cycle. In the photosynthetic stage, Fe has already demonstrated the ability to interfere negatively in the process of stomach opening, which will lead to a reduction in the diffusion of CO₂ to mesophiles and a decrease in the activity of the carboxylation phase of photosynthesis [45,67]. These Fe capacities may explain the non-elevation of the oxidation reactions of the PSI, added to the decrease in the growth rate of the plants, despite the increase in pigment content and photosynthetic performance.

The content of constituent elements analysis after 20 days, showed little Fe translocation to the aerial part. It was verified the highest metal contents in the roots of plants submitted to treatments of 8mM in sulfate form and EDTA, with 4.12% and 3.45% of dry weight, respectively, which corresponds to an increase of 250% in root Fe levels when compared to treatments in the 4mM concentration (Supplementary file). The high Fe levels present in the root region may be part of a strategy observed in some plants, which consists in the allocation of Fe in the vacuole of non-photosynthesizing tissues or with low production, aiming at protecting the primary metabolism [68,69]. This process is concomitant with other mechanisms that, in an attempt to block the entrance of the metal, modify the pH of the region close to the root, favoring the oxidation of Fe²⁺ in non-absorbable Fe³⁺, causing the formation of Fe plates [70].

In the same root region, it was possible to notice the potassium (K) levels at doses of 8mM dropped 70% in ferrous sulfate and 50% in chelated Fe, compared to the control (Supplementary file F and J). Stress, whether biotic or abiotic, is a recognized agent disturbing the metabolism of K [71,72]. Also, it is known that high Fe concentrations affect the balance of various ions, especially K [73]. Some studies show the proportional relationship between high Fe levels and significant ion loss [74,75,76,77]. Excess Fe leads to the formation and accumulation of nitric oxide (NO) in root cells, and NO production responds significantly to increased exposure to Fe [78,79]. NO can stimulate the activation of non-selective cationic channels (NSCCs), which are primarily responsible for K efflux [80,73]. K is an essential osmotic cell activator, acting crucially in opening and closing the stomata and in protein synthesis. The drop in its content in 8mM treatments may be one of the possible causes of the damage that compromised the growth of *C. papaya*.

4. CONCLUSIONS

Fe, both in its reduced and chelated form, strongly inhibits germination, germination speed, root growth, and the accumulation of biomass of *C. papaya* seeds. FeEDTA can stimulate the activity of the enzyme POX, but without indications of oxidative stress in *C. papaya* plants. High Fe content causes elevation of chlorophyll a, b, and photosynthetic performance of *C. papaya*, but affected initial growth with a decrease in the size of the radicle, aerial part, leaf area, accumulation of biomass, and levels of K. Thus, the productivity of this species is severely limited in areas affected by Fe accumulation.

5. REFERENCES

1. Espindola HS, Nodari ES, Santos MAD. Rio Doce: riscos e incertezas a partir do desastre de Mariana (MG). Rev. Bras. Hist. 2019 Jul; 39 (81): 141-162, doi: 10.1590/1806-93472019v39n81-07.
2. Silva GP, Fontes MPF, Costa LM, Venegas VHA. Potencialidade de plantas para revegetação de estéreis e rejeito da mineração de ferro da mina de alegria, Mariana-MG. Pesqui. Agropecu. Trop. 2006 Sep; 36 (3): 165-172.
3. Ahlert RJ. Análise proteômica diferencial em raízes de plântulas de arroz (*Oriza sativa* L.) submetidas ao estresse por ferro [dissertation]. Pelotas (RS): Universidade Federal de Pelotas; 2010. 82 p.

4. Barbosa MR, Araújo Silva MM, Willadino L, Ulisses C, Rangel Camara T. Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio em plantas. *Ciênc. Rural*. 2014 Mar; 44 (3): 453-460, doi: 10.1590/S0103-84782014000300011.
5. Kampfenkel K, Van Montagu M, Inzé D. Effects of iron excess on *Nicotiana plumbaginifolia* plants (implications to oxidative stress). *Plant Physiol*. 1995 Mar; 107 (3): 725-735, doi: 10.1104/pp.107.3.725.
6. Laurett L, Fernandes AA, Schmildt ER, Almeida CP, Pinto MLPB. Desempenho da alface e da rúcula em diferentes concentrações de ferro na solução nutritiva. *Rev. Ciênc. Agrar*. 2017 Jan; 60 (1): 45-52, doi: 10.4322/rca.2466.
7. Bataglia OC, Mascarenhas HAA. Toxicidade de ferro em soja. *Bragantia*. 1981 Jul; 40 (1): 199-203.
8. Krohling CA, Eutrópio FJ, Figueira FF, Campostrini E, Dobbss LB, Ramos AC. Níveis tóxicos de ferro em lavouras de café conilon (*Coffea canephora* L.) em solos de tabuleiros costeiros. *Coffee Sci*. 2016 Apr; 11(2): 255-266.
9. Martins D, Costa A. A cultura do mamoeiro: tecnologias de produção. Vitória: Incaper; 2003. 497p.
10. De Lima JF, Peixoto CP, Da Silva Ledo CA. Índices fisiológicos e crescimento inicial de mamoeiro (*Carica papaya* L.) em casa de vegetação. *Ciênc. agrotec*. 2007 Sep; 31 (5): 1358-1363, doi: 10.1590/S1413-70542007000500013.
11. IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção Agrícola Municipal 2018 [Internet]. Rio de Janeiro: IBGE. 2019 – [Acesso 30 Janeiro 2020]. Disponível em: <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/es/linhares/pesquisa/15/11863?indicador=11986&ano=2018&localidade1=0&tipo=ranking>.
12. Wanderley LJ, Mansur MS, Milanez B, Pinto RG. Desastre da Samarco/Vale/BHP no Vale do Rio Doce: aspectos econômicos, políticos e socio ambientais. *Ciênc. Cult*. 2016 Jul; 68(3): 30-35, doi: 10.21800/2317-66602016000300011.
13. Canatto BF. Caracterização geoquímica dos sedimentos da bacia do Rio Gualaxo do Norte [Monograph] Ouro Preto (MG): Universidade Federal de Ouro Preto; 2017. 83 p.
14. Viana JHM, Costa AM. A ciência do solo como instrumento para a recuperação das áreas afetadas pelo desastre de Mariana e dos solos na Bacia do Rio Doce. *Sociedade Brasileira de Ciência do Solo*. 2016 Jan; 42 (1): 24-27.
15. De Araújo ASF, Monteiro RTR. Indicadores biológicos de qualidade do solo. *Biosci. J*. 2007 Jul; 23 (3): 66-75.

16. Ferreira AG, Borghetti F. Germinação: do básico ao aplicado. Porto Alegre: Artmed; 2005. 323 p.
17. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regras para análise de sementes. Brasília: Mapa/ACS; 2009. 399p.
18. Maguire JD. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. *Crop Sci.* 1962; 2(2): 176-177, doi: 10.2135/cropsci1962.0011183X000200020033x.
19. Formagio ASN, Masetto TE, Baldivia DS, Vieira MC, Zarate NAH, Pereira ZV. Potencial alelopático de cinco espécies da família Annonaceae. *R. Bras. Bioci.* 2010 Oct; 8(4): 349-354.
20. Echer FR, Dominato JC, Creste JE. Absorção de nutrientes e distribuição da massa fresca e seca entre órgãos de batata-doce. *Hortic. Bras.* 2009 Jun; 27 (2): 176-182, doi: 10.1590/S0102-05362009000200010.
21. Hoagland DR, Arnon DI. The waterculture method for growing plants without soil. Berkeley: Agric. Exp. Stn; 1950. 31p.
22. Lichtenthaler HK. Chlorophyll and carotenoids-pigments of photosynthetic biomembranes. *Method Enzymol.* 1987; 148: 350-382, doi: 10.1016/0076-6879(87)48036-1.
23. Strasser BJ, Strasser RJ. Measuring fast fluorescence transients to address environmental questions: The JIP-test. In: Mathis P, editor. *Photosynthesis: from 74 Light to Biosphere. Proceedings of the 10th International Photosynthesis Congress; 1995 Aug 20-25; Montpellier, France: Kluwer Academic Publishers; 1995. p. 977-980, doi: 10.1007/978-94-009-0173-5_1142.*
24. Dedavid BA, Gomes CI, Machado G. Microscopia eletrônica de varredura: aplicações e preparação de amostras: materiais poliméricos, metálicos e semicondutores. Porto Alegre: EdiPUCRS; 2007. 60 p.
25. Del Longo OT, Goinzlez CA, Pastori GM, Trippi VS. Antioxidant defenses under hyperoxygenic and hyperosmotic conditions in leaves of two lines of maize with differential to drought. *Plant Cell Physiol.* 1993 Oct; 37 (7): 1023-1028, doi: 10.1093/oxfordjournals.pcp.a078515.
26. Giannopolitis CN, Ries SK. Superoxide dismutases: Occurrence in higher plants. *Plant Physiol.* 1977 Feb; 59(2): 309-314, doi: 10.1104/pp.59.2.309.
27. Beauchamp C, Fridovich I. Superoxide Dismutase: Improved Assays and an Assay Applicable to Acrylamide Gels. *Anal Biochem.* 1971 Nov; 44(1): 276-87, doi: 10.1016/0003-2697(71)90370-8.

28. Kar M, Mishra D. Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. *Plant Physiol.* 1976 Feb; 57: 315-319, doi: 10.1104/pp.57.2.315.
29. Chance B, Maehley AC. Assay of catalases and peroxidases. *Method Enzymol.* 1955 Jan; 2:764-775, doi: 10.1016/S0076-6879(55)02300-8.
30. Havir EA, McHale NA. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco-leaves. *Plant Physiol.* 1987 Jun; 84(2): 450-455, doi: 10.1104/pp.84.2.450.
31. Anderson MD, Prasad TK, Stewart CR. Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase, and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotyls of maize seedlings. *Plant Physiol.* 1995 Dec; 109(4): 1247-1257, doi: 10.1104/pp.109.4.1247.
32. Peixoto PHP, Cambraia J, Sant'anna R, Mosquim PR, Moreira MA. Aluminum effects on lipid peroxidation and on the activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. *Rev. Bras. Fisiol. Veg.* 1999 Jan; 11(3): 137-143.
33. Broadley M, Brown PIC, Rengel Z, Zhao F. Function of nutrients: micronutrients. 3rd ed. Amsterdam (Netherlands): Elsevier Academic Press; 2012. Chapter 7, Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants; p. 191-248, doi: 10.1016/C2009-0-63043-9.
34. Verma L, Pandey, N. The Effect of Iron Toxicity on Seed Germination and Early Seedling Growth of Green Gram (*Vigna radiata* L. Wilczek). *Int.* 2017 Aug; 6 (8): 1427-1430.
35. Ravet K, Touraine B, Boucherez J, Briat JF, Gaymard F, Cellier F. Ferritins control interaction between iron homeostasis and oxidative stress in Arabidopsis. *Plant J.* 2009 Feb; 57(3): 400-412, doi:10.1111/j.1365-313X.2008.03698.x.
36. Kobayashi T, Nishizawa NK. Iron uptake, translocation, and regulation in higher plants. *Annu Rev Plant Biol.* 2012 Jan; 63:131-152, doi: 10.1146/annurev-arplant-042811-105522.
37. Li W, Khan MA, Yamaguchi S, Kamiya Y. Effects of heavy metals on seed germination and early seedling growth of Arabidopsis thaliana. *Plant Growth Regul.* 2005 May; 46: 45-50, doi: 10.1007/s10725-005-6324-2.
38. Chakravarty B, Srivastava S. Toxicity of some heavy metals in vivo and in vitro in Helianthus annuus. *Mutat Res.* 1992 Dec; 283 (4): 287-294, doi: 10.1016/0165-7992(92)90061-l.
39. Nagajyoti PC, Lee KD, Sreekanth TVM. Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. *Environ Chem Lett.* 2010 Jul; 8: 199-216, doi: 10.1007/s10311-010-0297-8.
40. Bewley JD, Black M. Physiology and biochemistry of seeds. New York: Springer-Verlag; 1983. 378p.

41. Wierzbicka M, Obidzinska J. The effect of lead on seed imbibition and germination in different plant species. *Plant Sci.* 1998 Oct; 137(2): 155-171, doi: 10.1016/S0168-9452(98)00138-1.
42. Nenova V. Effect of iron supply on growth and photosystem II efficiency of pea plants. *Gen.Appl. Plant Physiol.* 2006 Jan; 32: 81-90.
43. McDonald I, Sloan GC, Zijlstra AA, Matsunaga N, Matsuura M, Kraemer KE, Mehraban P, Zadeh AA, Sadeghipour HR. Iron toxicity in rice (*Oryza sativa* L.), under different potassium nutrition. *Asian J Plant Sci.* 2008 Mar; 7(3): 251-259, doi: 10.3923/ajps.2008.251.259.
44. Becana M, Moran JF, Iturbe-Ormaetxe I. Iron dependent oxygen free radical generation in plants subjected to environmental stress: toxicity and antioxidant protection. *Plant Soil.* 1998 Apr; 201(1): 137-147.
45. Pereira EG. Efeitos fisiológicos e bioquímicos causados pela deposição de ferro particulado em *Clusia hilariana*, uma espécie de restinga [dissertation]. Viçosa (MG): Universidade Federal de Viçosa; 2006. 54 p.
46. Jucoski GO. Toxicidade de ferro e metabolismo antioxidativo em *Eugenia uniflora* L. [thesis]. Viçosa (MG): Universidade Federal de Viçosa; 2011. 93p.
47. Adamski JM. Respostas morfológicas de *Ipomoea batatas* L. em função da concentração de ferro [dissertation]. Pelotas (RS): Universidade Federal de Pelotas; 2011. 64 p.
48. Ozdemir F, Bor M, Demiral T, Türkan I. Effects of 24-epibrassinolide on seed germination, seedling growth, lipid peroxidation, proline content and antioxidative system of rice (*Oryza sativa* L.) under salinity stress. *Plant Growth Regul.* 2004 Mar; 42(3): 203-211.
49. Mittler, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* 2002 Sep;7(9): 405-410, doi: 10.1016/s1360-1385(02)02312-9.
50. Chatterjee C, Gopal R, Dube BK. Impact of iron stress on biomass, yield, metabolism and quality of potato (*Solanum tuberosum* L.) *Sci. Hortic.* 2006 Mar; 108 (1): 1-6, doi: 10.1016/j.scienta.2006.01.004.
51. Kumar P, Tewari RK, Sharma PN. Modulation of copper toxicity-induced oxidative damage by excess supply of iron in maize plants. *Plant Cell Rep.* 2008 Feb; 27(2): 399-409, doi: 10.1007/s00299-007-0453-1.
52. Fang WC, Kao CH. Enhanced peroxidase activity in rice leaves in response to excess of iron, copper and zinc. *Plant Sci.* 2000 Oct; 158 (1-2): 71-76, doi: 10.1016/S0168-9452(00)00307-1.

53. Stein RRJ, Duarte GL, Spohr MG, Lopes SIG, Fett JP. Distinct physiological responses subjected to iron toxicity under field conditions. *Annals of Applied Biology*. 2009 Feb; 154(2): 269-277, doi: 10.1111/j.1744-7348.2008.00293.x.
54. Sperotto RA, Ricachenevsky FK, Stein RJ, Waldow VA, Fett JP. Iron stress in plants: dealing with deprivation and overload. *Plant Stress*. 2010 Jan; 4(2): 57-69.
55. Streit NM, Canterle LP, Do Canto MW, Hecktheuer LHH. As clorofilas. *Ciênc. Rural*. 2005 May; 35 (3): 748-755, doi: 10.1590/S0103-84782005000300043.
56. Sacramento BL, Cruz TS, Silva LL, Mota KNAB, Azevedo Neto AD, Da Bahia R. Pigmentos e teores de solutos orgânicos em plantas de aguapé sob estresse salino. *Enciclopédia Biosfera*. 2014 Jul; 10(18): 3344-3354.
57. Chandra R, Kang H. Mixed heavy metal stress on photosynthesis, transpiration rate, and chlorophyll content in poplar hybrids. *Forest Sci Technol*. 2015 Jun; 12 (2): 55-61, doi: 10.1080/21580103.2015.1044024.
58. Devi Prasad PV, Devi Prasad PS. Effects of cadmium, lead and nickel on three freshwater green algae. *Water Air Soil Pollut*. 1982 Apr; 17: 263-268, doi: 10.1007/BF00283156.
59. Ma B, Xu A, Zhang X, Wu L. Chlorophyll change and spectral response of maize seedling under iron stress. In: 2016 IEEE International Geoscience and Remote Sensing Symposium (IGARSS); 2016 Jul 10-15; Beijing, China: IEEE; p. 6397-6400, doi: 10.1109/IGARSS.2016.7730672.
60. Rivas R, Oliveira MT, Santos MG. Three cycles of water deficit from seed to young plants of *Moringa oleifera* woody species improves stress tolerance. *Plant Physiol Biochem*. 2013 Feb; 63: 200-208, doi: 10.1016/j.plaphy.2012.11.026.
61. Oliveira MT, Dias CM, Frosi G, Santos MG. Different mechanisms drive the performance of native and invasive woody species in response to leaf phosphorus supply during periods of drought stress and recovery. *Plant Physiol Biochem*. 2014 Sep; 82: 66-75, doi: 10.1016/j.plaphy.2014.05.006.
62. Santos Junior RN. Fisiologia de Acessos de *Jatropha Curcas* L. Cultivados em Solo Contendo Lama do Rio Doce [dissertation]. Vitória (ES): Universidade Federal do Espírito Santo; 2018. 64 p.
63. Frosi G, Harand W, Oliveira MTD, Pereira S, Cabral SP, Montenegro AADA, Santos MG. Different physiological responses under drought stress result in different recovery abilities of two tropical woody evergreen species. *Acta Bot. Bras*. 2017 Apr; 31 (2): 153-160, doi: 10.1590/0102-33062016abb0375.
64. Neves NR. Respostas fisiológicas e antioxidativas em plantas de *Eugenia uniflora* L. submetidas ao excesso de ferro e chuva ácida [dissertation]. Viçosa (MG): Universidade Federal de Viçosa; 2004. 37p.

65. Marschner H. Mineral nutrition of higher plants. London: Academic Press; 1995. 890p.
66. Pinto SDS, Souza AED, Oliva MA, Pereira EG. Oxidative damage and photosynthetic impairment in tropical rice cultivars upon exposure to excess iron. *Sci. Agric.* 2016 May; 73(3): 217-226, doi:10.1590/0103-9016-2015-0288.
67. Pereira EG, Oliva MA, Rosado-Souza L, Mendes GC, Colares DS, Stopato CH, Almeida AM. Iron excess affects rice photosynthesis through stomatal and non-stomatal limitations. *Plant Sci.* 2013 Mar; 201-202: 81-92, doi: 10.1016/j.plantsci.2012.12.003.
68. Engel K, Asch F, Becker M. Classification of rice genotypes based on their mechanisms of adaptation to iron toxicity. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 2012 Dec; 175(6): 871-881, doi: 10.1002/jpln.201100421.
69. Thomine S, Vert G. Iron transport in plants: better be safe than sorry. *Curr Opin Plant Biol.* 2013 Jun; 16(3): 322-327, doi: 10.1016/j.pbi.2013.01.003.
70. Wu LB, Shhadi M, Gregorio G, Matthus E, Becker M, Frei M. Genetic and physiological analysis of tolerance to acute iron toxicity in rice. *Rice.* 2014 May; 7(8): 1-12, doi: 10.1186/s12284-014-0008-3.
71. Demidchik V, Shabala SN, Coutts KB, Tester MA, Davies JM. Free oxygen radicals regulate plasma membrane Ca^{2+} and K^{+} permeable channels in plant root cells. *J Cell Sci.* 2003 Jan;116 (1): 81-88, doi: 10.1242/jcs.00201.
72. Demidchik V, Cui TA, Svistunenko D, Smith SJ, Miller AJ, Shabala S, Sokolik A, Yurin, V. Arabidopsis root K^{+} efflux conductance activated by hydroxyl radicals: single-channel properties, genetic basis and involvement in stress-induced cell death. *J Cell Sci.* 2010 May; 123(9): 1468-79, doi: 10.1242/jcs.064352.
73. Zhang L, Li G, Wang M, Di D, Sun L, Kronzucker HJ, Shi W. Excess iron stress reduces root tip zone growth through nitric oxide-mediated repression of potassium homeostasis in Arabidopsis. *New Phytol.* 2018 Jul; 219 (1): 259-274, doi: 10.1111/nph.15157.
74. Li H, Yang X, Luo AC. Ameliorating effect of potassium on iron toxicity in hybrid rice. *J. Plant Nutr.* 2001; 24(12): 1849-1860, doi: 10.1081/PLN-100107598.
75. Li GJ, Xu WF, Kronzucker HJ, Shi WM. Ethylene is critical to the maintenance of primary root growth and Fe homeostasis under Fe stress in Arabidopsis. *J Exp Bot.* 2015 Apr; 66(7): 2041-54, doi: 10.1093/jxb/erv005.
76. Li GJ, Kronzucker HJ, Shi WM. Root developmental adaptation to Fe toxicity: mechanisms and management. *Plant Signal Behav.* 2016 Feb; 11(1): e1117722, doi: 10.1080/15592324.2015.1117722.
77. Gao PP, Zheng GH, Wu YH, Liu P. Effect of exogenous potassium on photosynthesis and antioxidant enzymes of rice under iron toxicity. *Russ. J. Plant Physiol.* 2014 Jan; 61: 47–52, doi: 10.1134/S1021443714010051.

78. Arnaud N, Murgia I, Boucherez J, Briat JF, Cellier F, Gaymard F. An iron-induced nitric oxide burst precedes ubiquitin-dependent protein degradation for Arabidopsis AtFer1 ferritin gene expression. *J Biol Chem*. 2006 Aug; 281(33): 23579-88.
79. Touraine B, Briat JF, Gaymard F. GSH threshold requirement for NO-mediated expression of the ArabidopsisAtFer1 ferritin gene in response to iron. *FEBS Lett*. 2012 Mar; 586(6): 880-883, doi: 10.1016/j.febslet.2012.02.016.
80. Reyt G, Boudouf S, Boucherez J, Gaymard F, Briat JF. Iron and ferritin dependent ROS distribution impact Arabidopsis root system architecture. *Mol Plant*. 2014 Nov; 8: 439-453, doi: 10.1093/mp/ssu133.

Artigo 3 - Efeitos do Ferro sobre o estresse oxidativo em plantas de *C. hololeuca* e *C. papaya*

Resumo

O Ferro é essencial ao desenvolvimento vegetal, todavia seu excesso é capaz de provocar aumento na geração de espécies reativas de oxigênio e o estresse oxidativo em plantas. O objetivo deste trabalho foi verificar os efeitos de concentrações elevadas de ferro sobre o estresse oxidativo de sementes e plantas jovens de *Cecropia hololeuca* e *Carica papaya*. As espécies foram submetidas às concentrações de 0.045, 4 e 8mM de Ferro na forma de sulfato ferroso e FeEDTA. A germinação e o crescimento inicial das espécies foram conduzidos em câmara de crescimento, utilizando-se temperatura constante de 25°C e fotoperíodo 12h/12h. Foi realizado o teste de peroxidação lipídica por meio da extração e quantificação do malonaldeído e do peróxido de hidrogênio. Os experimentos foram instalados em delineamento inteiramente casualizado e as médias submetidas à análise de variância e ao teste de Tukey a 5% de significância. A aplicação do ferro não ocasionou elevação significativa nos teores de malonaldeído e peróxido de hidrogênio na germinação de *C. hololeuca* e *C. papaya*. Nas plantas jovens o teor de peróxido de hidrogênio não sofreu alteração em nenhum dos tratamentos. Entretanto, foi possível observar um aumento expressivo na concentração de malonaldeído em ambas as espécies quando expostas ao FeEDTA 4 e 8mM. Estes resultados indicam uma sensibilidade de *C. hololeuca* e *C. papaya* a altos níveis de ferro, com ampliação do processo de estresse oxidativo que pode prejudicar seu crescimento e desenvolvimento inicial.

Palavras-chave: Embaúba, Mamão, Malonaldeído

Abstract

Iron is essential for plant development, however its excess is able to increase the content of reactive oxygen species and oxidative stress in plants. The aim of this work was to verify the effects of high iron concentrations on the oxidative stress of seeds and young plants of *Cecropia hololeuca* and *Carica papaya*. The species were subjected to concentrations of 0.045, 4 and 8mM of Iron in the form of ferrous sulfate and FeEDTA. The germination and the initial growth of the species were carried out in a growth chamber, using a constant temperature of 25°C and a photoperiod 12h /

12h. The lipid peroxidation test was performed through the extraction and quantification of malonaldehyde and hydrogen peroxide. The experiments were installed in a completely randomized design and the means were submitted to analysis of variance and Tukey's test at 5% significance. The application of iron did not cause a significant increase in the levels of malonaldehyde and hydrogen peroxide in the germination of *C. hololeuca* and *C. papaya*. In young plants, the hydrogen peroxide content did not change in any of the treatments. However, it was possible to observe a significant increase in the concentration of malonaldehyde in both species when exposed to FeEDTA 4 and 8mM. These results indicate a sensitivity of *C. hololeuca* and *C. papaya* when subjected to high levels of iron, with an amplification of the oxidative stress process that may harm their growth and initial development.

Keywords: Embaúba, Mamão, Malondialdehyde

1. Introdução

O crescimento da atividade mineradora e do beneficiamento do minério de Ferro (Fe), associado ao descaso quanto aos resíduos oriundos destes processos, são considerados um dos maiores responsáveis pelo aumento dos níveis de Fe no ambiente (RIOS, 2017). Este metal apresenta características não biodegradáveis e, quando encontrado em sua forma solúvel, é considerado um dos principais contaminantes de cursos d'água (PUNSHON et al. 2003; BAI et al. 2009). Essa situação pode gerar inúmeros efeitos adversos ao ecossistema aquático, já que o Fe pode ser prontamente utilizável pelas plantas e tóxico quando absorvido em excesso. A toxidez por Fe está intimamente relacionada a danos em diversas comunidades vegetais, entretanto os possíveis prejuízos ao crescimento e frutificação de espécies cultivadas e ao estabelecimento da vegetação ciliar vêm ganhando cada vez mais interesse (ZHANG et al. 2010; BARBOSA et al. 2014).

As matas ciliares se destacam como uma das mais importantes mantenedoras do equilíbrio ambiental, pois contribuem para uma menor taxa de erosão e lixiviação, maior controle do fluxo de água para o solo, e manutenção da qualidade das águas que chegam aos corpos hídricos (CASTRO et al. 2013). Contudo, essas matas também apresentam a capacidade de reter uma vasta gama de poluentes, em especial o Fe, que devido à sua persistência no meio pode se acumular nas

espécies vegetais e aumentar a vulnerabilidade do ambiente (TORRES et al. 2014). A espécie *Cecropia hololeuca* Miq. (Cecropiaceae), conhecida como embaúba-prateada, apresenta ampla distribuição no território brasileiro e está presente, sobretudo, em matas ciliares (VICENTINI et al. 2008). Tal fato pode representar um risco ao seu desenvolvimento, uma vez que pode absorver concentrações elevadas de Fe e sofrer com efeitos danosos ao seu crescimento e estabelecimento (SAHRAWAT, 2005; SAALTINK et al. 2017).

A espécie *Carica papaya* L. (Caricaceae) é uma importante fruteira de alta ocorrência na região sudeste brasileira, com destaque para o estado do Espírito Santo. Representa um dos pilares econômicos capixabas, com aproximadamente 60 toneladas de frutas vendidas anualmente para o resto do país e para o exterior (IBGE, 2019). Em virtude de suas plantações se localizarem próximas a regiões com altos teores de resíduos de mineração ricos em Fe, sua produtividade pode ser profundamente afetada pela elevação nos níveis do metal (RIOS, 2017).

Apesar do Fe ser um micronutriente essencial no desenvolvimento vegetal ao atuar em baixas concentrações, seu excesso está relacionado a prejuízos na germinação e no crescimento ao estimular o aumento do teor de espécies reativas de oxigênio (ROS) e do processo oxidativo (BECKER & ASCH, 2005; KOBAYASHI & NISHIZAWA, 2012). Dentre as principais ROS originadas pela elevação dos teores de Fe, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) se destaca como um dos compostos mais estressantes em virtude da sua alta produção e capacidade oxidativa (JUCOSKY et al. 2013). Os danos oxidativos podem se manifestar em diversas partes do metabolismo vegetal, porém a ocorrência de peroxidação lipídica na membrana celular, estimada com base na produção do malonaldeído (MDA), produto final da peroxidação lipídica, é considerada uma das variáveis mais confiáveis que indicam a intensificação do estresse oxidativo ocasionado por altos níveis de Fe (JUCOSKY et al. 2013; PINTO et al. 2016).

Assim, o presente trabalho teve como objetivo investigar os possíveis efeitos oxidativos de concentrações tóxicas de Fe sobre sementes e plantas jovens de *C. hololeuca* e *C. papaya*.

2. Materiais e métodos

Sementes de *C. hololeuca* e *C. papaya* foram armazenadas no laboratório de sementes e ecofisiologia florestal da Universidade Federal do Espírito Santo em Vitória (ES) em câmara fria (5°C) até o início do experimento. Foram utilizadas as concentrações de 0.045 (controle), 4mM e 8mM aplicados na forma de sulfato ferroso ou FeEDTA. Para se analisar os possíveis efeitos oxidativos na germinação, sementes de ambas as espécies foram previamente desinfetadas com hipoclorito de sódio 2% por 2 minutos e colocadas em placas de Petri, tendo como substrato duas folhas de papel filtro umedecidas com as soluções correspondentes a cada tratamento. Todo o processo foi conduzido em câmara de germinação B.O.D., utilizando-se temperatura constante de 25 °C, fotoperíodo 12h/12h por dez dias (FERREIRA & BORGUETTI, 2005).

Para a verificação do estresse oxidativo sobre as plantas jovens, as espécies foram semeadas e cultivadas em vasos de polietileno de 0,5L com substrato não adubado mais areia lavada na proporção 1:1. Foram montados dez vasos com uma planta cada, totalizando dez unidades experimentais por tratamento. Vinte dias após a germinação as plântulas foram então submetidas aos respectivos tratamentos com as soluções aplicadas via solo. O cultivo foi realizado em sala de crescimento a 25° C, fotoperíodo 12h/12h com duração de cinquenta dias. Todas as plantas foram mantidas em solução de Hoagland a meia força iônica e pH 5,0 (HOAGLAND & ARNON, 1950).

Ambos os experimentos foram instalados em delineamento inteiramente casualizados, sendo as médias dos tratamentos submetidas à análise de variância (ANOVA) e posteriormente ao teste de Tukey a 5% de significância. Todas as análises estatísticas foram executadas utilizando o programa Sisvar versão 5.6 (FERREIRA, 2011).

Foi determinado, para as sementes e plantas jovens, o grau de oxidação e danos celulares por meio dos teores de H₂O₂ e MDA (CAKMAK & HORST, 1991). Amostras de 300 mg das sementes e do tecido vegetal foram maceradas com auxílio de nitrogênio líquido em 2,0 mL de ácido tricloroacético (TCA) 0,1% (p/v). O homogeneizado foi centrifugado a 12.000 xg, 4° C, durante 15 min,

coletando-se o sobrenadante. Para o teor de MDA, foram utilizadas alíquotas de 1 mL do sobrenadante adicionadas a 1mL de solução de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,5% (p/v) preparado em TCA 20% (p/v). As amostras foram então incubadas a 90 °C por 35 min, seguido por resfriamento rápido em gelo. As leituras foram realizadas em 532 nm e 600 nm. O teor de MDA foi calculado a partir do coeficiente de extinção de 155 mM cm⁻¹ aplicando a fórmula: teor de MDA (ηM) = [(A₅₃₂-A₆₀₀)/1,56] x 105 (BUEGE & AUST, 1978). O teor de H₂O₂ foi baseado no método de Alexieva et al. (2001). O meio de reação consistiu de 0,5 mL do sobrenadante adicionado a 0,5 mL de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,0) e 2 mL de 1 M de iodeto de potássio (KI). A reação desenvolveu-se no escuro por 1h e a absorbância lida em 390 nm. A concentração de H₂O₂ foi calculada através de uma curva padrão.

3. Resultados e discussão

Os resultados evidenciaram que a exposição às duas fontes de Fe nas concentrações de 4 e 8 mM não acarretou aumento nos teores de MDA e H₂O₂ na germinação das espécies *C. hololeuca* e *C. papaya* (Figura 1).

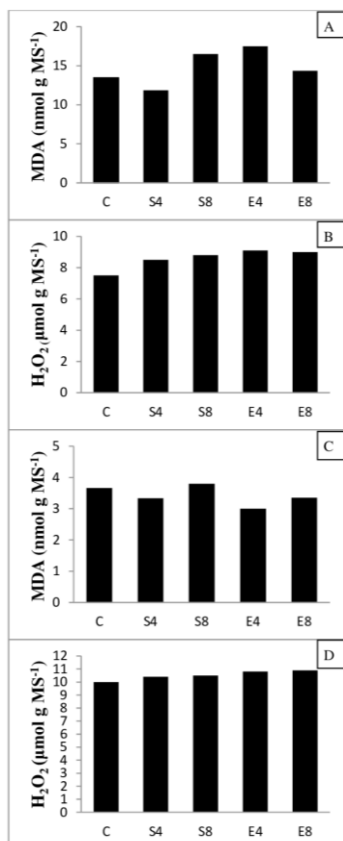


Figura 1: Teores de MDA e H₂O₂ na germinação das sementes de *C. hololeuca* (A e B) e *C. papaya* (C e D) submetidas a elevados teores de Fe. (Teste de Tukey, p<0,05). C: Controle; S4: Sulfato ferroso 4mM; S8: Sulfato ferroso 8mM; E4: FeEDTA 4mM; E8: FeEDTA 8mM.

As altas concentrações de metais pesados têm a capacidade de afetar profundamente a germinação de sementes. Isso foi demonstrado em diversos trabalhos que verificaram a interação destes compostos e o processo germinativo (AKINCI & AKINCI, 2010; NASR, 2013; WAN et al. 2013; PRODANOVIC et al. 2016). Outros autores também encontraram efeitos deletérios ao se utilizar concentrações elevadas de Fe em espécies de Trigo, Feijão e do gênero *Vigna* (EL RASAFI et al. 2016; VERMA & PANDEY, 2017) e, mais especificamente na germinação de *C. hololeuca* e *C. papaya*, foi possível observar queda significativa da porcentagem de germinação dessas duas espécies quando expostas ao Fe (RODRIGUES FILHO et al. 2020).

Os múltiplos efeitos adversos ocasionados pelo Fe podem ser atribuídos às desordens bioquímicas e à diminuição da absorção de água e de diversos íons na fase de embebição (KOBAYASHI & NISHIZAWA, 2012). Outro mecanismo pelo qual o Fe pode gerar toxidez é pela elevação dos teores de H₂O₂ e de outras ROS (BECKER & ASCH, 2005). Em excesso estes compostos oxidantes se acumulam nos tecidos vegetais e culminam no aumento da peroxidação lipídica da membrana e dos teores de MDA (SIDDIQUI et al. 2011; GALL & RAJAKARUNA, 2013; SENEVIRATNE et al. 2019).

Todavia, isso não foi verificado na fase germinativa de sementes de *C. hololeuca* e *C. papaya*, visto que as concentrações de MDA e H₂O₂ não apresentaram diferença significativa entre os tratamentos, o que parece não indicar a presença de estresse oxidativo na germinação de ambas as espécies. Isso pode ser explicado pela natureza da camada tegumentar, que consegue agir como um bloqueio físico à contaminação por metais limitando sua absorção. Outra estratégia é vista através do aumento da atividade antioxidante do vegetal, reduzindo os níveis de peroxidação e consequentemente os teores de MDA, fato já confirmado em algumas espécies expostas a altas concentrações de Cobre, Cádmio e também Fe (PEREIRA, 2006; BANU DOĞANLAR, 2013). Além disso, outros sistemas de proteção podem atuar compartimentalizando o Fe no vacúolo celular por meio da complexação a peptídeos e proteínas ligantes, impedindo assim sua atividade (SOUZA et al. 2011; FRYZOVA et al. 2017).

Apesar de não promover estresse oxidativo durante a fase germinativa, doses elevadas de Fe provocaram elevação significativa do teor de MDA em ambas as espécies quando expostas ao FeEDTA no crescimento inicial e comparadas ao controle (Figura 2). Não houve diferença no teor de H₂O₂ nesta fase.

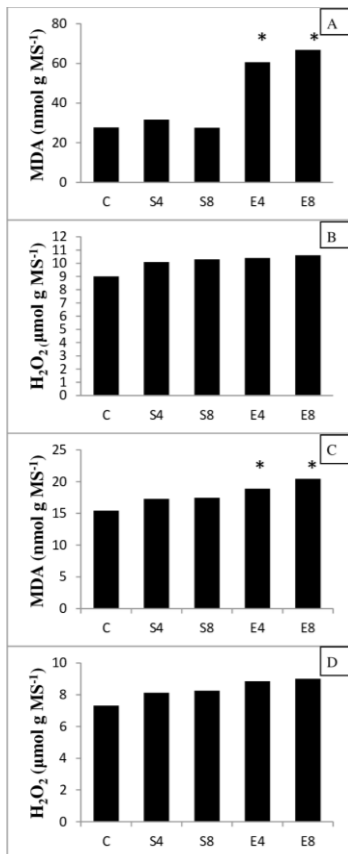


Figura 2: Teores de MDA e H₂O₂ em plantas jovens de *C. hololeuca* (A e B) e *C. papaya* (C e D) submetidas a elevados teores de Fe. O asterisco indica diferença significativa em relação ao controle (Teste de Tukey, $p < 0,05$). C: Controle; S4: Sulfato ferroso 4mM; S8: Sulfato ferroso 8mM; E4: FeEDTA 4mM; E8: FeEDTA 8mM.

Os efeitos oxidativos do Fe sob plantas jovens de *C. hololeuca* e *C. papaya* foram constatados para ambas as concentrações de FeEDTA utilizadas. O Fe na versão quelada apresenta alta capacidade absorptiva, o que desencadeia uma maior acumulação no tecido radicular, órgão de absorção primário e primeira parte a entrar em contato com o metal, bem como no caule e folhas das plantas (ZHAO et al. 2010; ONAGA et al. 2016). O Fe absorvido acarretou uma maior produção de ROS nas plantas jovens, que provocou a peroxidação dos lipídeos de membrana, fato comprovado pelo aumento significativo nos teores de MDA das plantas tratadas com 4 e 8mM de FeEDTA. O aumento do processo de peroxidação lipídica associado ao Fe é bastante conhecido, acarreta sérios efeitos sobre o crescimento, e já foi demonstrado em diferentes espécies florestais e cultivadas (SINHÁ et al. 1997; KUKI

et al. 2008; STEIN et al. 2008; JUCOSKY et al. 2013). A membrana celular é considerada o primeiro e principal local de ataque das ROS geradas pela exposição a elevados teores de Fe. Este ataque por sua vez desencadeia a oxidação dos lipídeos, que estimula o incremento do teor de aldeído malônico (MDA), subproduto da decomposição dos ácidos graxos de membrana e fator comprobatório da presença do excesso de radicais livres (WU et al., 1998; GARCIA 2009; PINTO et al. 2016).

Entretanto, o aumento da peroxidação lipídica observada neste estudo não pode ser atribuído, inicialmente, a elevação da produção de H_2O_2 . O H_2O_2 é considerado um dos principais e mais comuns agentes oxidantes produzidos por vegetais quando expostos a altas concentrações de Fe, com capacidade de atravessar facilmente as membranas e degradar lipídeos e enzimas por meio da oxidação de seus grupos tiol (GADJEV et al., 2008; KARUPPANAPANDIAN et al., 2011; JUCOSKY et al., 2013). Porém, não foi observado elevação do teor desse metabólito nas espécies *C. hololeuca* e *C. papaya* quando submetidas às duas fontes de Fe nas concentrações de 4 e 8mM. Resultados similares também foram encontrados para plantas de *Oriza sativa* L. quando expostas a concentrações de até 10mM de Fe, com elevação do MDA sem alteração no teor de H_2O_2 (FANG et al. 2001). Esse fato pode ser justificado pela atuação dos mecanismos de defesa antioxidante presentes nos vegetais, capazes de neutralizar a toxicidade das diversas ROS produzidas, com destaque para o H_2O_2 . Nas plantas, as enzimas Catalase e Peroxidases (POX) atuam eficazmente no processo de detoxificação, convertendo o H_2O_2 a H_2O e oxigênio molecular. Esta reação impede a elevação na concentração de H_2O_2 e consequentemente os danos oxidativos causados por esse composto, fato já constatado em trabalhos que avaliaram a capacidade antioxidante frente a elevados teores de Fe (ADAMSKY, 2011; JUCOSKY et al. 2013). Mais especificamente, trabalhando também com as espécies *C. hololeuca* e *C. papaya* submetidas ao estresse férrico nas concentrações de 8mM, Rodrigues Filho et al. (2020) perceberam elevação da atividade da enzima POX destas espécies quando expostas ao FeEDTA, o que parece indicar uma via de controle dos níveis de H_2O_2 e de mitigação para esse estresse.

Concomitantemente à não elevação dos teores de H_2O_2 , o aumento nos níveis de MDA e peroxidação lipídica nas plantas de ambas as espécies, quando submetidas

ao FeEDTA, parece indicar a presença de outros compostos oxidantes atuando nestes vegetais. O Fe em altas concentrações também é capaz de intensificar a produção de outras ROS como o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) e o radical hidroxila (HO^\cdot). Estudos recentes têm demonstrado que o $^1\text{O}_2$ pode se difundir por todas as partes da planta e que a peroxidação lipídica pode ser causada em grande parte por sua ação (TRANTAPHYLIDES & HAVAUX, 2009; BARBOSA et al. 2014). Já o HO^\cdot pode ser formado diretamente pela ação do Fe, ou através da reação de Fenton, onde o H_2O_2 acumulado nos tecidos reage com o Fe dando origem a novas moléculas de HO^\cdot (NIKOLIC & PAVLOVIC, 2018), fato este que pode também explicar a estabilidade dos teores de H_2O_2 nas plantas. O HO^\cdot por sua vez é considerado um dos ROS mais oxidantes e pode, quando em excesso, ocasionar alterações em bases nitrogenadas, em proteínas pela oxidação de grupos sulfidríla, e causar danos a moléculas de carboidratos e ácidos graxos, culminando no processo de peroxidação lipídica (BARBOSA et al. 2014; PINTO et al. 2016).

4. Conclusões

Sementes de *C. hololeuca* e *C. papaya* não apresentam evidências de estresse oxidativo quando expostas a concentrações de 4 e 8mM de Fe durante o período germinativo. Entretanto, em sua forma EDTA o Fe é capaz de gerar danos oxidativos em plantas jovens das duas espécies, promovendo peroxidação lipídica e consequentemente danos ao metabolismo e crescimento. Dentre os compostos responsáveis por esse processo, descarta-se o H_2O_2 e destaca-se, possivelmente, o oxigênio singlete e o radical hidroxila. Assim, elevada concentração de Fe no ambiente, pode ser fator limitante ao estabelecimento de espécies ciliares e cultivadas.

5. Referências

ADAMSKI, J. M. **Respostas morfológicas de *Ipomoea batatas* L. em função da concentração de ferro.** Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas. 2011.

- AKINCI, I. E. & AKINCI, S. Effect of chromium toxicity on germination and early seedling growth in melon (*Cucumis melo* L.). **African Journal of Biotechnology**, 9(29), 4589–4594, 2010.
- ALEXIEVA V, SERGIEV I, MAPELLI S, KARANOV, E. The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. **Plant Cell Environment** 24:1337–1344. 2001.
- BAI, J., CUI, B., XU, X., DING, Q., & GAO, H. Heavy metal contamination in riverine soils upstream and downstream of a hydroelectric dam on the Lancang River, China. **Environmental Engineering Science**, v. 26, n. 5, p. 941-946, 2009.
- BANU DOĞANLAR, Z. Metal accumulation and physiological responses induced by copper and cadmium in *Lemna gibba*, *L. minor* and *Spirodela polyrhiza*. **Chemical Speciation & Bioavailability**, v. 25, n. 2, p. 79-88, 2013.
- BARBOSA, M. R.; MEDEIROS DE ARAÚJO SILVA, M.; WILLADINO, L.; ULISSES, C., & RANGEL CAMARA, T. Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio em plantas. **Ciência Rural**, v. 44, n. 3, 2014.
- BECKER, M. & ASCH, F. Iron toxicity in rice-conditions and management concepts. **J. Plant Nutr. Soil Sci.** v. 168, 558–573. 2005.
- BUEGE JA, AUST SD. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in Enzimology** 52: 302–310. 1978.
- CAKMAK, I.; HORST, W.J. Effect of aluminum on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glicine max*). **Physiologia Plantarum**, 83: 463-468, 1991.
- CASTRO, M. N.; CASTRO, R. M.; DE SOUZA, C. A importância da mata ciliar no contexto da conservação do solo. **Renefara**, v. 4, n. 4, p. 230-241, 2013.
- EL RASAFI, T.; NOURI, M.; BOUDA, S. & HADDIOUI, A. The effect of Cd, Zn and Fe on seed germination and early seedling growth of wheat and bean. **Ekológia (Bratislava)**, v. 35, n. 3, p. 213-223, 2016.
- 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, n. 1, p. 75-80, 2001.
- FERREIRA, D.F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciênc. e Agrotec.**, v. 35, n.6, p. 1039-1042, 2011.
- FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. **Germinação**: do básico ao aplicado. Porto Alegre: Artmed, 2005.
- FRYZOVA, R., POHANKA, M., MARTINKOVA, P., CIHLAROVA, H., BRTNICKY, M., HLADKY, J. & KYNICKY, J. Oxidative stress and heavy metals in plants. In *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Volume 245* (pp. 129-156). Springer, Cham. 2017.

GADJEV, I. et al. Programmed cell death in plants: new insights into redox regulation and the role of hydrogen peroxide. *International Review of Cell and Molecular Biology*, v.270, p.87-144, 2008.

GALL, J. E., & RAJAKARUNA, N. The physiology, functionalgenomics, and applied ecology of heavy metal-tolerant Brassicaceae. In M. Lang (Ed.), *Brassicaceae: Characterization,functional genomics and health benefits* (pp.121–148). New York: Nova. 2013.

GARCIA, M. P. **Alterações fisiológicas e avaliação do estresse oxidativo durante o desenvolvimento e a senescência de folhas se soja, *Glycine max L.*** Tese de Doutorado. Universidade Federal de Viçosa. 2009.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D.I. The water-culture method for growing plants without soil. *Circular. California agricultural experiment station*, v. 347, n. 2, 1950.

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção Agrícola Municipal 2018 [Internet]. Rio de Janeiro (RJ): IBGE; 2019 – [accessed 2020 Dec 28]. Disponível:<https://cidades.ibge.gov.br/brasil/es/linhares/pesquisa/15/11863?indicador=11986&ano=2018&localidade=1=0&tipo=ranking>.

JUCOSKI, G. DE O.; CAMBRAIA, J.; RIBEIRO, C.; OLIVEIRA, J.A.; PAULA, DE S.O. & OLIVA,M.A. Impact of iron toxicity on oxidative metabolism in young *Eugenia uniflora L.* plants. ***Acta Physiol Plant***, v. 35, p. 1645-1657, 2013.

KARUPPANAPANDIAN, T. et al. Reactive oxygen species in plants: their generation, signal transduction, and scavenging mechanisms. ***Australian Journal of Crop Science***, v.5, n.6, p.709-725, 2011.

KOBAYASHI, T.; NISHIZAWA, N.K. Iron uptake, translocation, and regulation in higher plants. ***Annual Review of Plant Biology*** 63: 131-152. 2012.

KUKI, KN, OLIVA MA, PEREIRA EG, COSTA AC, CAMBRAIA J. Effects of simulated deposition of acid mist and iron oreparticulate matter on photosynthesis and the generation ofoxidative stress in *Schinus terebinthifolius* Raddi and *Sophora tomentosa L.* ***Sci Total Environ*** 403:207–214. 2008.

NASR, N. Germination and seedling growth of maize (*Zea mays L.*) seeds in toxicity of aluminum and nickel. ***Merit Research Journal of Environmental Science and Toxicology***, 1(5), 110–113. 2013.

NIKOLIC, M. & PAVLOVIC, J. Plant responses to iron deficiency and toxicity and iron use efficiency in plants. In: ***Plant micronutrient use efficiency***. Academic Press, 2018. p. 55-69.

ONAGA G, DRAMÉ KN, ISMAIL AM. Understanding the regulation of iron nutrition: can it contribute to improving iron toxicity tolerance in rice? ***Functional Plant Biology*** 43: 709–726. 2016.

PEREIRA, E. G. **Efeitos fisiológicos e bioquímicos causados pela deposição de ferro particulado em *Clusia hilariana*, uma espécie de restinga.** Dissertação de mestrado. Dissertação de mestrado em Fisiologia Vegetal, UFV, 66 pg. 2006.

PINTO, S.S et al. Oxidative damage and photosynthetic impairment in tropical rice cultivars upon exposure to excess iron. **Scientia Agricola**, v. 73, n. 3, p. 217-226, 2016.

PRODANOVIC, O., PRODANOVIC, R., PRISTOV, J. B., MITROVIC, A., & RADOTIC, K. (2016). Effect of cadmium stress on antioxidative enzymes during the germination of Serbian spruce [*Picea omorika* (Pan.) Purkyne]. **African Journal of Biotechnology**, 11(52), 11377–11385.

PUNSHON, T., GAINES, K. F., BERTSCH, P. M., & BURGER, J. Bioavailability of uranium and nickel to vegetation in a contaminated riparian ecosystem. **Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal**, v. 22, n. 5, p. 1146-1154, 2003.

RIOS, C. O. **Respostas fisiológicas de gramíneas ao déficit hídrico visando a revegetação de pilha de estéril**. Universidade Federal de Viçosa. 2017.

RODRIGUES FILHO, J., CORTE, V. B., PERIN, I. T. D. A. L., DOS SANTOS, C. R., & DA SILVA, R. W. Effects of iron toxicity on germination and initial growth of *Carica papaya* L. **Scientia Plena**, v. 16, n. 10, 2020.

RODRIGUES FILHO, J., CORTE, V. B., PERIN, I. T. D. A. L., DA SILVA, R. W., & REIS, C. Iron Toxicity on Germination and Early Growth of *Cecropia hololeuca* Miq. **Ensaios e Ciência C Biológicas Agrárias e da Saúde**, v. 24, n. 5-esp., p. 584-592, 2020.

SAALTINK, R. M., DEKKER, S. C., EPPINGA, M. B., GRIFFIOEN, J., & WASSEN, M. J. Plant-specific effects of iron-toxicity in wetlands. **Plant and soil**, v. 416, n. 1-2, p. 83-96, 2017.

SAHRAWAT, K. L. Iron toxicity in wetland rice and the role of other nutrients. **Journal of Plant Nutrition**, v. 27, n. 8, p. 1471-1504, 2005.

SENEVIRATNE, M., RAJAKARUNA, N., RIZWAN, M., MADAWALA, H. M. S. P., OK, Y. S., & VITHANAGE, M. Heavy metal-induced oxidative stress on seed germination and seedling development: a critical review. **Environmental geochemistry and health**, v. 41, n. 4, p. 1813-1831, 2019.

SIDDIQUI MH, AL-WHAIBI MH, BASALAH MO. Interactive effect of calcium and gibberellin on nickel tolerance in relation to antioxidant systems in *Triticum aestivum* L. **Protoplasma**. 248:503–11. 2011.

SINHÁ S, GUPTA M, CHANDRA P. Oxidative stress induced by iron in *Hydrilla verticillata* Royle: response of antioxidants. **Ecotox Environ Safe** 38:286–291, 1997.

SOUZA, E P; DA SILVA, I F; FERREIRA, L E. Mecanismos de tolerância a estresses por metais pesados em plantas. **Current Agricultural Science and Technology**, v. 17, n. 2, 2011.

STEIN RRJ, DUARTE GL, SPOHR MG, LOPES SIG, FETT JP. Distinct physiological responses subjected to iron toxicity under field conditions. **Ann Appl Biol** 154:269–277. 2008.

TORRES, I. F. A., DE ATAÍDE COSTA, T., ANDRADE, M. B., TEIXEIRA, M. D. S. T., REIS, L. D. P. G. R., DOS SANTOS RODRIGUES, L., & MELO, M. M. Elementos traço e agrotóxicos em amostras de água, sedimento e mata ciliar coletadas no entorno do ribeirão da mata (MG). **Revista de Estudos Ambientais**, v. 15, n. 1, p. 6-19, 2014.

VERMA, L. & PANDEY, N. The Effect of Iron Toxicity on Seed Germination and Early Seedling Growth of Green Gram (*Vigna radiata* L. Wilczek). **International Journal of Science and Research**, v.6, n.8, 2017.

VICENTINI, E., REBOUÇAS, M. T., ARRUDA, R. A., & RIBEIRO, L. Aspectos demográficos de espécies de Cecropia em fragmento de mata ciliar da usina hidrelétrica Rio Bonito, Santa Maria de Jetibá–ES. **Natureza on line**, v. 6, n. 2, p. 66-73, 2008.

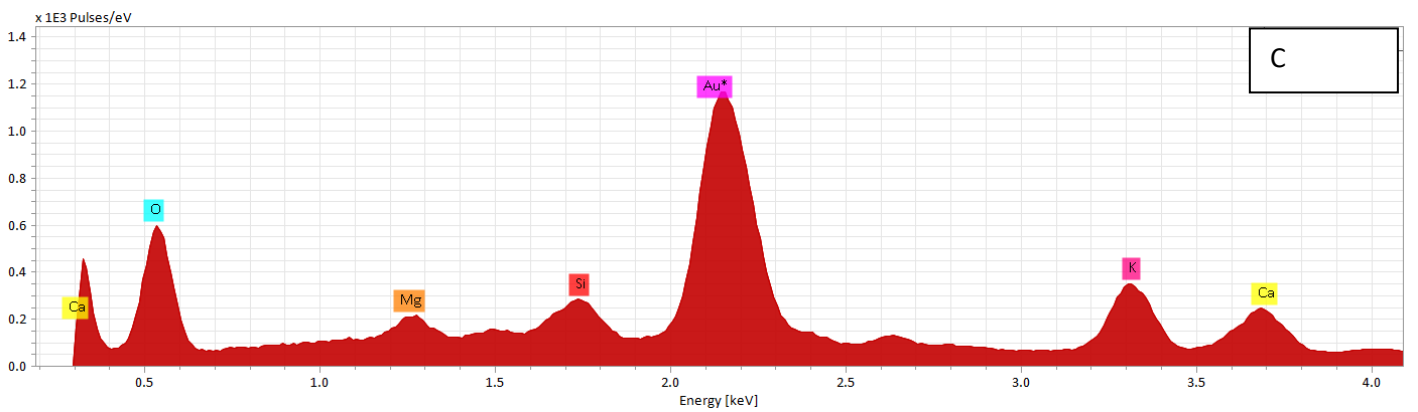
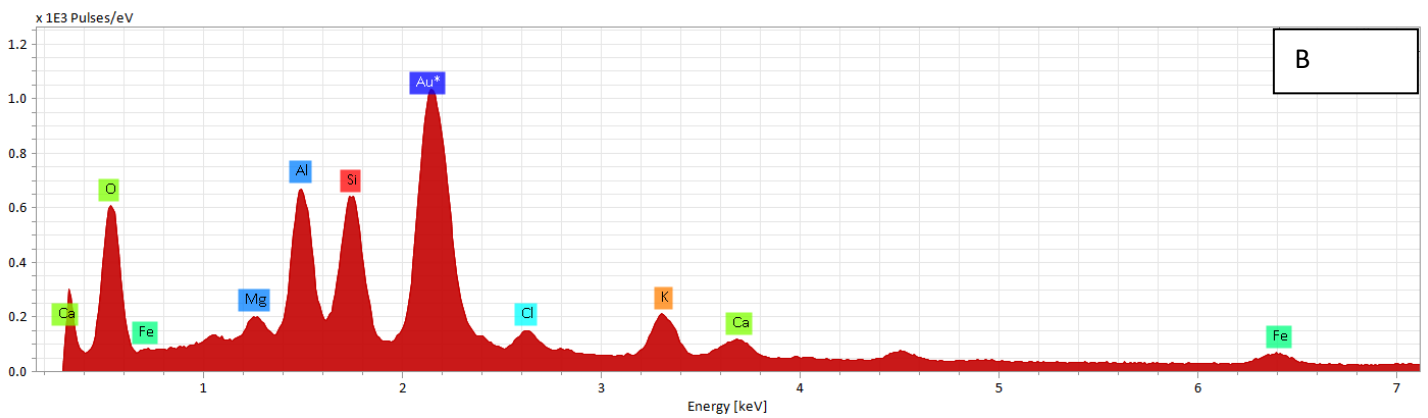
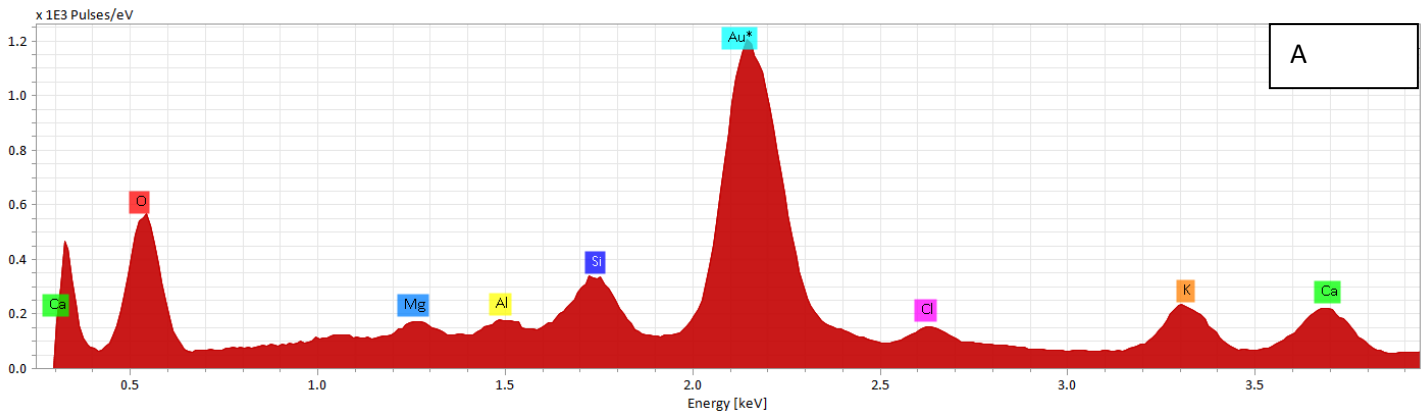
WAN, M., WANG, M., ZHOU, F., & YANG, L. Effects of arsenic on seed germination of mung bean and black soybean. **Journal of Hubei University (Natural Science)** 3, 006. 2013.

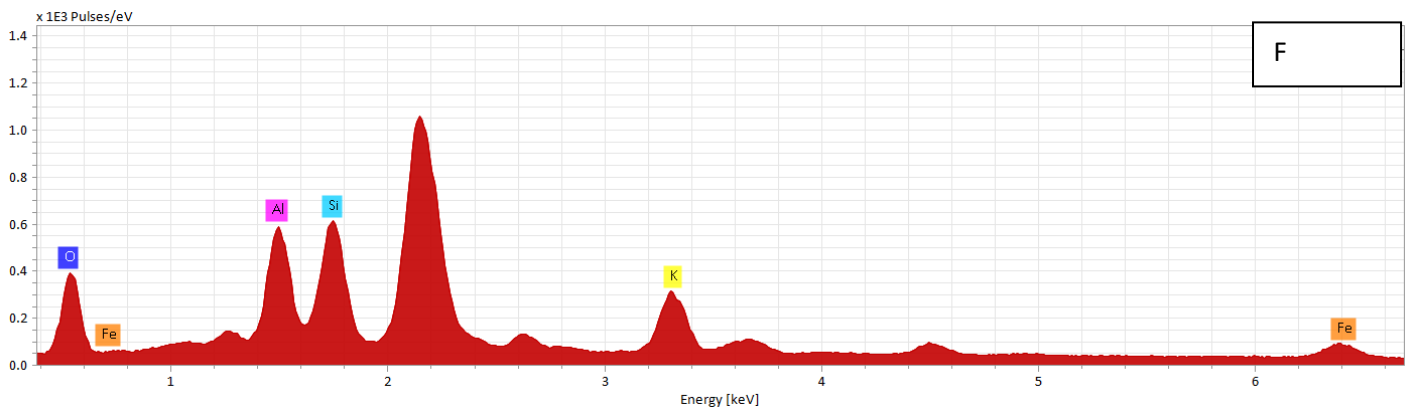
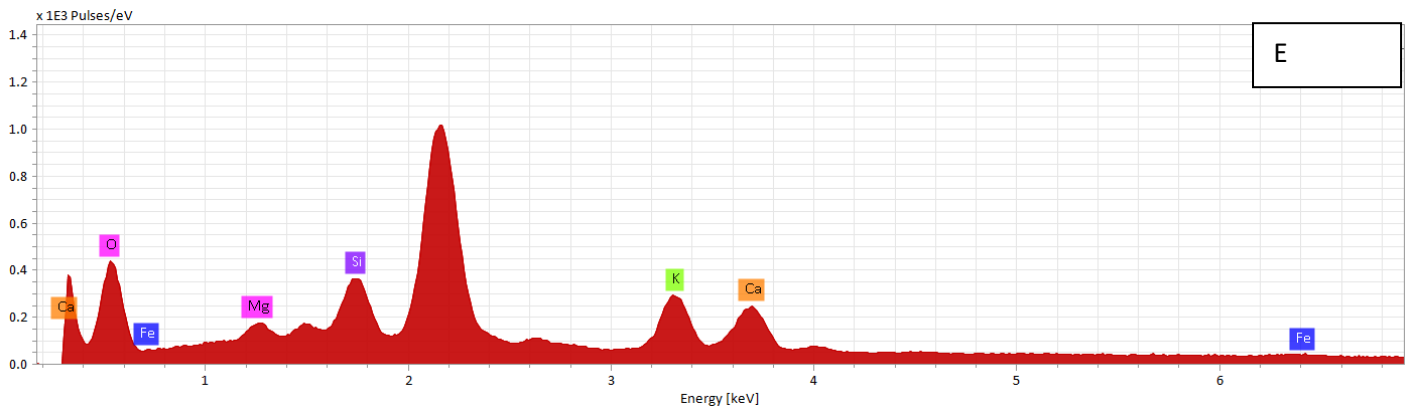
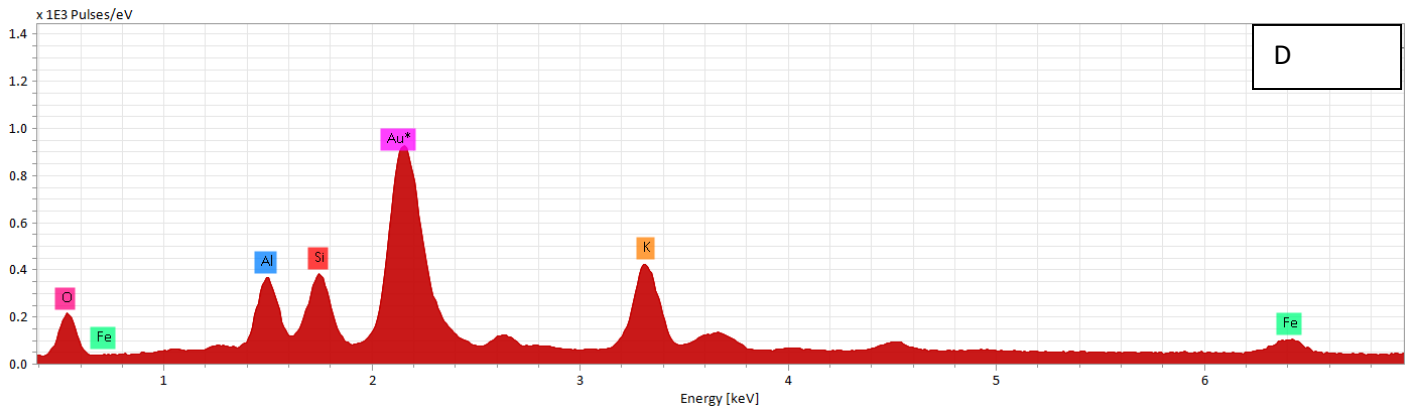
WU, P.; HU, B.; LIAO, C.Y.; ZHU, J.M.; WU, Y.R.; SENADHIRA, D.; PATERSON, A.H. Characterization of tissue tolerance to iron by molecular markers in different lines of rice. **Plant and Soil** 203: 217-226. 1998.

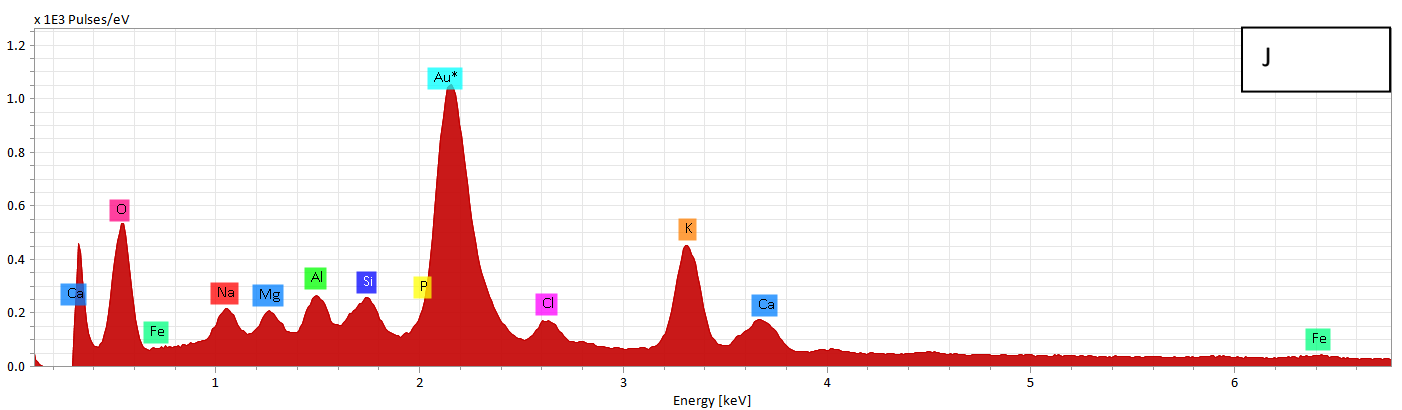
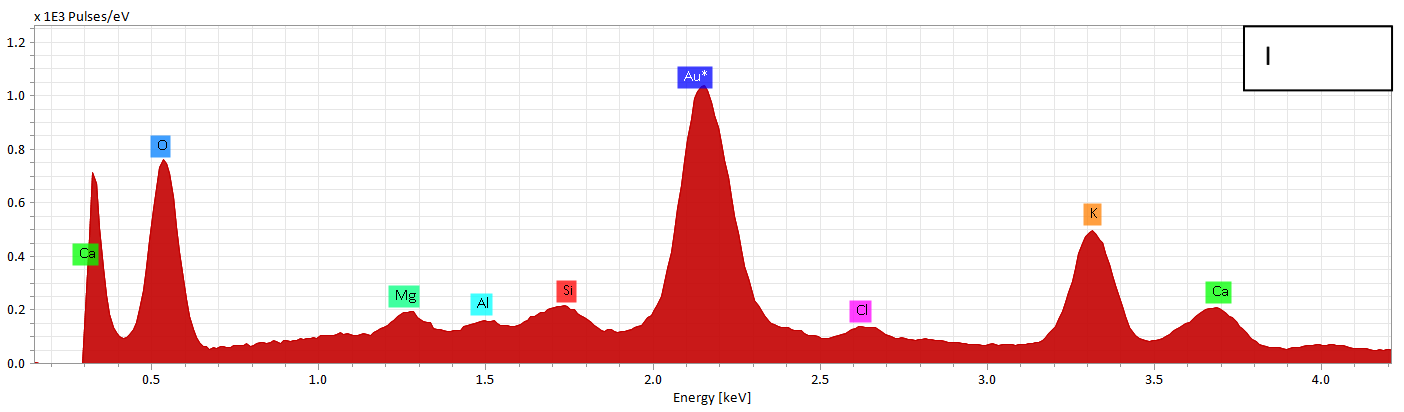
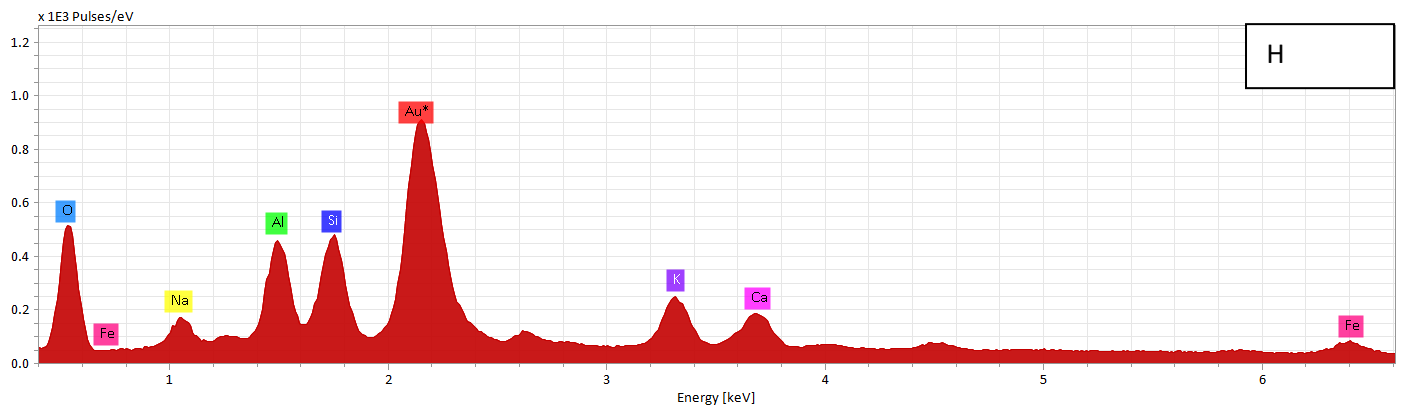
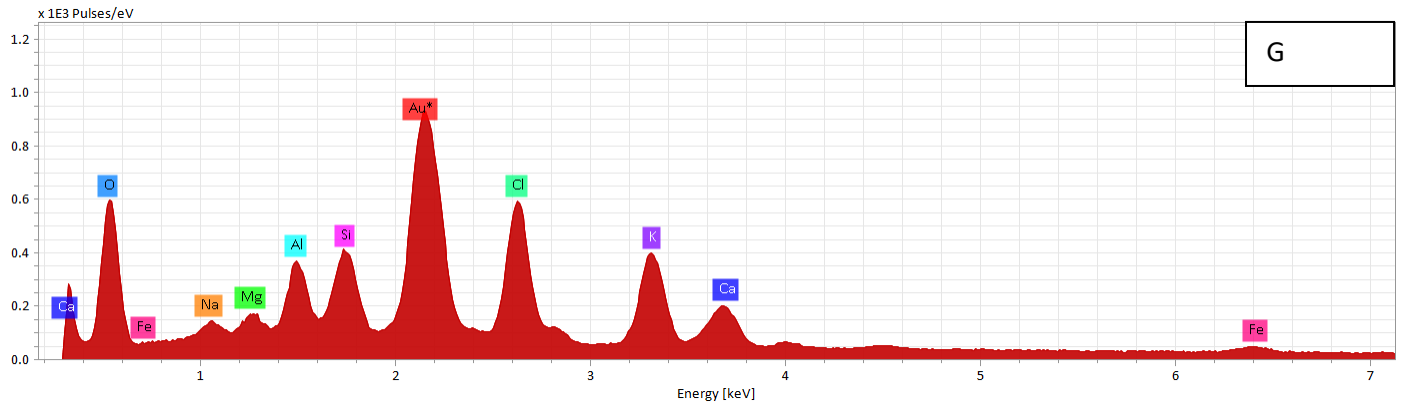
ZHANG, H., CUI, B., XIAO, R., & ZHAO, H. Heavy metals in water, soils and plants in riparian wetlands in the Pearl River Estuary, South China. **Procedia Environmental Sciences**, v. 2, n. 5, p. 1344-1354, 2010.

ZHAO, K., LIU, X., XU, J., & SELIM, H. M. Heavy metal contaminations in a soil–rice system: identification of spatial dependence in relation to soil properties of paddy fields. **Journal of Hazardous Materials**, 181(1-3), 778-787. 2010.

Supplementary file: Effects of iron stress, using dispersive energy spectroscopy (EDS), on the content of mineral elements of *C. hololeuca* seedlings grown under iron stress. A - Control leaf B - Control root; C - Fe²⁺ 4mM leaf D - Fe²⁺ 4mM root; E - Fe²⁺ 8mM leaf F - Fe²⁺ 8mM root; G - EDTA 4mM leaf H - EDTA 4mM root; I - EDTA 8mM leaf J - EDTA 8mM root.







Supplementary file: Effects of Fe stress, using Energy Dispersive Spectroscopy (EDS), on the mineral element content of *C. papaya* seedlings. A - Leaf control B - Root control; C - Fe²⁺ 4mM leaf D - Fe²⁺ 4mM root; E - Fe²⁺ 8mM leaf F - Fe²⁺ 8mM root; G - EDTA 4mM leaf H - EDTA 4mM root; I - 8mM EDTA leaf J - 8mM root EDTA.

