

**EFEITO DO pH E FERRO II NA GERMINAÇÃO E NO CRESCIMENTO DE
MUDAS MICROPROPAGADAS DE *Cedrela fissilis* (Meliaceae), UMA
ARBÓREA NATIVA AMEAÇADA DE EXTINÇÃO**

BENJAMIM VALENTIM DA SILVA

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO –
UENF**

Campos dos Goytacazes –RJ

Fevereiro de 2018

**EFEITO DO pH E FERRO II NA GERMINAÇÃO E NO CRESCIMENTO DE
MUDAS MICROPROPAGADAS DE *Cedrela fissilis* (Meliaceae), UMA
ARBÓREA NATIVA AMEAÇADA DE EXTINÇÃO**

BENJAMIM VALENTIM DA SILVA

“Dissertação apresentado ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências do título de Mestre em Produção Vegetal”.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Claudete Santa Catarina
Co-orientador: Prof. Dr. Alessandro Coutinho
Ramos

**Campos dos Goytacazes –RJ
Fevereiro de 2018**

FICHA CATALOGRÁFICA
UENF - Bibliotecas
Elaborada com os dados fornecidos
pelo autor.

S586

Silva, Benjamim Valentim da.

Efeito do pH e Ferro II na germinação e no crescimento de mudas micropropagadas de *Cedrela fissilis* (Meliaceae), uma arbórea nativa ameaçada de extinção / Benjamim Valentim da Silva. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2018.

61 f. : il. Bibliografia:
54 - 61.

Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, 2018.
Orientadora: Claudete Santa Catarina.

1. Germinação. 2. Micropropagação. 3. Sulfato de ferro. 4. Poliaminas. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 630

**EFEITO DO pH E FERRO II NA GERMINAÇÃO E NO CRESCIMENTO DE
MUDAS MICROPROPAGADAS DE *Cedrela fissilis* (Meliaceae), UMA
ARBÓREA NATIVA AMEAÇADA DE EXTINÇÃO**

BENJAMIM VALENTIM DA SILVA

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

Aprovada em 21 de Fevereiro de 2018.

Comissão Examinadora:

Pesquisador. Cesar Abel Krohling (D.Sc., Ecologia de Ecossistemas) - INCAPER

Prof. Alessandro Coutinho Ramos (D.Sc., Produção Vegetal) – UENF

Prof^a. Jackellinne Caetano Douéts Peres (D.Sc., Biociências e Biotecnologia) - SEEDUC

Prof^a. Claudete Santa Catarina (D.Sc., Biotecnologia) - UENF
(Orientadora)

Dedico este trabalho a Deus, aos meus pais, Walter Aguiar da Silva e Maria Valentim da Silva e irmão Sinésio Batista da Silva Neto, em especial para minhas tias Francisca Maria e Socorro e todos os familiares que me proporcionaram a realização desse sonho.

DEDICO E OFEREÇO ESTA CONQUISTA

AGRADECIMENTO

A Deus, por permitir que eu chegasse até aqui;

À Professora Claudete Santa Catarina e Alessandro Coutinho Ramos pelos ensinamentos, orientação, compreensão e confiança no desenvolvimento deste trabalho;

Aos meus familiares, em especial à minha mãe Maria Valentim da Silva e ao meu pai Walter Aguiar da Silva, ao meu irmão Sinésio Batista da Silva Neto e todos os familiares que acreditaram e torceram sempre pelo meu sucesso;

Aos colegas do Laboratório de Biologia Celular e Tecidual (LBCT) pelo apoio nas dificuldades em todos os momentos deste trabalho e por todos os momentos de descontração vividos durante a realização;

A Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, pela oportunidade de qualificação. Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de mestrado;

Aos professores do curso, que contribuíram positivamente para a minha formação acadêmica, pela oportunidade de aprendizagem, confiança e incentivo;

Enfim, a todos que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho.

SULMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	vi
LISTA DE FIGURAS.....	vii
RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xii
1. INTRODUÇÃO .	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. Mata Atlântica	3
2.2. Usinas de mineração e o elemento Ferro.....	4
2.3. Metais pesados e seus efeitos na germinação	6
2.4. Metais pesados e os efeitos no crescimento de mudas micropropagadas	7
2.5. Estudos fisiológicos e bioquímicos durante a germinação e crescimento de mudas micropropagadas relacionados com o Ferro	8
2.5.2. Fe e seu efeito nos parâmetros fisiológicos.....	9
2.5.3. Poliaminas (PAs) e sua relação com estresse abiótico	10
3. OBJETIVO.....	12
3.1. Objetivo geral.....	12
3.2. Objetivos específicos:	12
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	14
4.1. Material vegetal.....	14
4.2. Efeito do ferro e pH na germinação de sementes.....	14
4.3. Efeito do ferro e pH no crescimento das mudas micropropagadas.....	15
4.3.1. Germinação <i>in vitro</i>	15
4.3.2. Obtenção das brotações <i>in vitro</i>	16
4.3.3. Enraizamento <i>ex vitro</i>	16
4.3.4. Tratamento com as diferentes concentrações de Fe e pH	17
4.4. Determinação da MF e MS	17
4.5. Análise de parâmetros biométricos	18
4.5.1. Determinação da área radicular e da parte aérea	18
4.5.2. Determinação da altura e diâmetro das mudas micropropagadas.....	19
4.5.3. Determinação de parâmetros fotossintéticos das mudas micropropagadas	19

4.6.	Determinação de PAs livres	20
4.7.	Determinação de nutrientes	20
4.8.	Análise estatística	21
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
5.1.	Efeito do ferro e pH na germinação de sementes.....	22
5.1.1.	Determinação da germinação	22
5.1.2.	Análises biométricas	24
5.1.3.	Determinação da MF e MS	29
5.1.4.	Determinação de PAs livres	30
5.1.5.	Determinação de nutrientes	32
5.2.	Efeito do ferro e pH no crescimento das mudas micropropagadas.....	34
5.2.1.	Determinação da altura e diâmetro	34
5.2.2.	Determinação da fluorescência da clorofila <i>a</i>	35
5.2.3.	Determinação das trocas gasosas	37
5.2.4.	Análises biométricas	39
5.2.5.	Determinação da área foliar e do caule.....	40
5.2.6.	Determinação da matéria fresca (MF) e matéria seca (MS)	41
5.2.7.	Determinação de poliaminas (PAs) livres.....	43
5.2.8.	Determinação de nutrientes em mudas micropropagadas.....	46
6.	RESUMO E CONCLUSÕES	52
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Concentração de nutrientes em raízes e folhas de plântulas de *Cedrela fissilis* após 15 dias de incubação em diferentes concentrações de sulfato de ferro (0, 4 e 8 mM) em pH 3,0..... 34
- Tabela 2** - Composição mineral em raízes de mudas micropropagadas de *cedrela fissilis* aos 60 dias de tratamento em diferentes concentrações de sulfato de ferro em pH 3,0 e 5,5..... 48
- Tabela 3** - Composição mineral em caules de mudas micropropagadas de *Cedrela fissilis* durante 60 dias de incubação em diferentes concentrações de sulfato de ferro em pH 3,0 e 5,5..... 50
- Tabela 4** - Composição mineral em folhas de mudas micropropagadas de *cedrela fissilis* aos 60 dias de tratamento em diferentes concentrações de sulfato de ferro em pH 3,0 e 5,5..... 51

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Efeito do efeito de diferentes concentrações de sulfato de ferro (0, 2, 4 e 8 mM) em pH 3,0 (A) e 5,5 (B) sobre a germinação de sementes de *Cedrela fissilis*. (n = 4; CV= 20,11%)..... 23

Figura 2. Comprimento (cm) da raiz (A) e aspectos morfológicos de plântulas de *Cedrela fissilis* aos 15 dias de incubação em diferentes concentrações de sulfato de ferro e pH 3,0 (B) e 5,5 (C). Letras maiúsculas diferentes denotam diferenças significativas entre as concentrações de sulfato de ferro em cada pH. Letras minúsculas diferentes denotam diferenças significativas entre os pHs testados para cada concentração de sulfato de ferro. Médias seguidas por letras diferentes são significativamente diferentes ($P < 0,05$) de acordo com o teste SNK. CV = coeficiente de variação. (n = 4; CV = 18,46%)..... 26

Figura 3. Valores referentes a área (A), volume (B) e diâmetro (C) radicular em plântulas de *Cedrela fissilis* aos 15 dias de incubação em diferentes concentrações de sulfato de ferro e em pH 3,0 e 5,5. Letras maiúsculas diferentes denotam diferenças significativas entre as concentrações de sulfato de ferro no mesmo pH. Letras minúsculas diferentes denotam diferenças entre os pH na mesma concentração de ferro. Médias seguidas por letras diferentes são significativamente diferentes ($P < 0,05$) de acordo com o teste SNK. CV = coeficiente de variação (n = 4; CV área = 32,22%; CV volume = 24,45%; CV diâmetro = 14,27%)..... 28

Figura 4. Matéria fresca (MF) da parte aérea (A) e da raiz (B) e matéria seca (MS) da parte aérea (C) e da raiz (D) de plântulas de *Cedrela fissilis* após 15 dias de incubação em diferentes concentrações de sulfato de ferro e pH 3,0 e 5,5. Letras maiúsculas diferentes denotam diferenças significativas entre as concentrações sulfato de ferro no mesmo pH. Letras minúsculas diferentes denotam diferenças significativas entre os pHs na mesma concentração de sulfato de ferro. Médias seguidas por letras diferentes são significativamente diferentes ($P < 0,05$) de acordo com o teste SNK. CV = coeficiente de variação (n = 4; CV MF da parte aérea = 17,24%; CV MF da raiz = 27,13%; CV MS da parte aérea = 10,10%; CV MS da raiz = 26,00%)..... 30

Figura 5. Conteúdo ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de MF) das PAs livres Put (A), Spd (B) e Spm (C), e PAs livres totais (D) em raízes e parte aérea de plântulas de *Cedrela fissilis* aos 15 dias de incubação em diferentes concentrações de sulfato de ferro em pH 3,0. Letras maiúsculas diferentes denotam diferenças significativas entre as concentrações de sulfato de ferro no mesmo pH. Letras minúsculas diferentes denotam diferenças significativas entre os tecidos (raiz e parte aérea) na mesma concentração de sulfato de ferro. Médias seguidas por letras diferentes são significativamente diferentes ($P < 0,05$) de acordo com o teste SNK. CV = coeficiente de variação. ($n = 3$; CV de Put = 18,19%; CV de Spd = 6,24%, CV de Spm = 14,12%; CV de PAs livres totais = 9,08%)..... 32

Figura 6. Diâmetro (A) e altura (B) da parte aérea das mudas micropropagadas de *Cedrela fissilis* após 60 dias de crescimento em diferentes concentrações de sulfato de ferro (0; 2,5; 5 e 10 mM) e pHs (3,0 e 5,5). Letras maiúsculas diferentes denotam diferenças significativas entre as concentrações de sulfato de ferro em cada pH. Letras minúsculas diferentes denotam diferenças significativas entre os pHs em cada concentração de sulfato de ferro. Médias seguidas por letras diferentes são significativamente diferentes ($P < 0,05$) de acordo com o teste SNK. CV = coeficiente de variação. ($n = 15$; CV do diâmetro = 22,85%; CV da altura = 18,65%)..... 35

Figura 7. Rendimento quântico máximo do fotossistema II (A) e teor relativo de clorofila (B) em mudas micropropagadas de *Cedrela fissilis* aos 60 dias em diferentes concentrações de sulfato de ferro (0; 2,5; 5 e 10 mM) e pHs (3,0 e 5,5). Letras maiúsculas diferentes denotam diferenças significativas entre as concentrações de sulfato de ferro em cada pH. Letras minúsculas diferentes denotam diferenças significativas entre os pHs em cada concentração de sulfato de ferro. Médias seguidas por letras diferentes são significativamente diferentes ($P < 0,05$) de acordo com o teste SNK. CV = coeficiente de variação. ($n = 4$; CV de Fv/Fm = 8,67%; CV do teor relativo de clorofila = 12,24%)..... 36

Figura 8. Taxa de assimilação líquida de carbono (A), condutância estomática (B) e taxa transpiratória (C) em mudas micropropagadas de *Cedrela fissilis* aos 60 dias de tratamento com diferentes concentrações de sulfato de ferro (0; 2,5; 5 e 10 mM) e pH (3,0 e 5,5). Letras maiúsculas diferentes denotam diferenças entre as concentrações de sulfato de ferro em cada pH. Letras minúsculas diferentes denotam diferenças significativas entre os dois pH em cada concentração de sulfato de ferro. Médias seguidas por letras diferentes são significativamente diferentes ($P < 0,05$) de acordo com o teste SNK. CV = coeficiente de variação. ($n = 4$; CV da taxa de assimilação líquida de carbono = 25,22%; CV da condutância estomática = 24,29%; CV da taxa transpiratória = 22,94%)..... 38

Figura 9. Comprimento (A), diâmetro (B), área superficial (C) e volume (D) radicular em mudas micropropagadas de *Cedrela fissilis* aos 60 dias de tratamento em diferentes concentrações de sulfato de ferro (0; 2,5; 5 e 10 mM) e em pH 3,0 e 5,5. Letras maiúsculas diferentes denotam diferenças significativas entre as concentrações de sulfato de ferro em cada pH. Letras minúsculas diferentes denotam diferenças significativas entre os pHs em cada concentração de sulfato de ferro. Médias seguidas por letras diferentes são significativamente diferentes ($P < 0,05$) de acordo com o teste SNK. CV = coeficiente de variação. ($n = 4$; CV do comprimento = 20,25%; CV do diâmetro = 7,95%; CV da área superficial = 23,56%; CV do volume = 29,01%)..... 40

Figura 10. Área foliar (A) e do caule (B) em mudas micropropagadas de *Cedrela fissilis* aos 60 dias de tratamento em diferentes concentrações de sulfato de ferro e pH 3,0 e 5,5. Letras maiúsculas diferentes denotam diferenças significativas entre as concentrações de sulfato de ferro em cada pH. Letras minúsculas diferentes denotam diferenças significativas entre os pHs em cada concentração de sulfato de ferro. Médias seguidas por letras diferentes são significativamente diferentes ($P < 0,05$) de acordo com o teste SNK. CV = coeficiente de variação. (n = 4; CV da área foliar = 26,87%; CV da área do caule = 16,48%)..... 41

Figura 11. Matéria fresca (MF) da folha (A), caule (C) e da raiz (E) e matéria seca (MS) da folha (B), caule (D) e da raiz (F) de mudas micropropagadas de *Cedrela fissilis* aos 60 dias de tratamento em diferentes concentrações de sulfato de ferro e pH 3,0 e 5,5. Letras maiúsculas diferentes denotam diferenças significativas entre as concentrações de sulfato de ferro em cada pH. Letras minúsculas diferentes denotam diferenças significativas entre os pHs em cada concentração de sulfato de ferro. Médias seguidas por letras diferentes são significativamente diferentes ($P < 0,05$) de acordo com o teste SNK. CV = coeficiente de variação. (n = 4; CV MF folha = 27,58%; CV MF caule = 23,56%; CV MF raiz = 27,42%; CV MS folha = 25,46%; CV MS caule = 28,51%; CV MS raiz = 27,50%)..... 42

Figura 12. Conteúdo ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de MF) de PAs livres Put (A), Spd (C) e Spm (E) na raiz e Put (B), Spd (D) e Spm (F) nas folhas de mudas micropropagadas de *Cedrela fissilis* aos 60 dias de tratamento com diferentes concentrações de sulfato de ferro e pH 3,0 e 5,5. Letras maiúsculas diferentes denotam diferenças significativas entre as concentrações de sulfato de ferro em cada pH. Letras minúsculas diferentes denotam diferenças significativas entre os pHs em cada concentração de sulfato de ferro. Médias seguidas por letras diferentes são significativamente diferentes ($P < 0,05$) de acordo com o teste SNK. CV = coeficiente de variação. (n = 3; CV Put raiz = 21,97%; CV Spd raiz = 24,12%, CV Spm raiz = 27,23%; CV Put folha = 17,38%; CV Spd folha = 22,78%, CV Spm folha = 22,86%)..... 45

Figura 13. Conteúdo ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de MF) de PAs livres totais em raiz (A) e folhas (B) de mudas micropropagadas plântulas de *Cedrela fissilis* aos 60 dias de tratamento com diferentes concentrações de sulfato de ferro em pH 3,0 e 5,5. Letras maiúsculas diferentes denotam diferenças significativas entre as concentrações de sulfato de ferro em cada pH. Letras minúsculas diferentes denotam diferenças significativas entre os pH em cada concentração de sulfato de ferro. Médias seguidas por letras diferentes são significativamente diferentes ($P < 0,05$) de acordo com o teste SNK. CV = coeficiente de variação. (n = 3; CV PAs livres totais raiz = 19,95%; CV PAs livres totais folha = 18,40%)..... 46

RESUMO

SILVA, Benjamim Valentim da. M.Sc. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Fevereiro de 2018. Efeito do pH e Ferro II na germinação e no crescimento de mudas micropropagadas de *Cedrela fissilis* (Meliaceae), uma arbórea nativa ameaçada de extinção. Orientadora: Prof^a. Dr^a. Claudete Santa Catarina.

A emissão de material sólido particulado de ferro (MSPFe) na natureza pode contribuir para a alteração da fitofisionomia da Mata Atlântica e pode configurar um impacto ambiental, afetando o crescimento das plantas. Diante disso, este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de diferentes concentrações de Ferro II e pH na germinação e no crescimento de mudas micropropagadas de *Cedrela fissilis*, analisando sua influência sobre os parâmetros morfológicos, fisiológicos e bioquímicos. Para a germinação, as sementes foram tratadas com solução aquosa em dois pHs (3,0 e 5,5) e cinco concentrações (0, 2, 4; 8 e 10 mM) de sulfato de ferro como fonte de Ferro II. A germinação (%) foi avaliada diariamente, e após 15 dias, foram determinadas as concentrações de matéria fresca (MF) e seca (MS), conteúdo de poliaminas (PAs) e nutrientes das plântulas. Para os estudos com mudas micropropagadas, as brotações aos 30 dias de enraizamento em substrato florestal e vermiculita (1:1; v/v) foram tratadas com solução de Hoagland contendo diferentes concentrações (0,0019; 2,5; 5; e 10 mM) de Sulfato de ferro em pH 3,0 e 5,5. As mudas foram irrigadas com os tratamentos em intervalos de 2 dias, e nos demais dias foi fornecida irrigação com água destilada.

As mudas foram mantidas em sala de aclimatização, com 16 h de luz ($22 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), a 25 ± 2 °C durante 30 dias, e posteriormente, foram transferidas para casa de vegetação e mantidas por 30 dias, totalizando 60 dias de tratamento. Após 60 dias foram determinados os parâmetros fotossintéticos (trocas gasosas, fluorescência e teor relativo de clorofila), e análises de MF, MS, área foliar, área e volume radicular, e conteúdo de nutrientes e PAs da parte aérea e da raiz foram realizadas. A germinação foi afetada pelas concentrações de sulfato de ferro e pH, com maior redução em sementes mantidas nas maiores concentrações de sulfato de ferro em pH 3,0 comparado ao pH 5,5. Em pH 5,5 a germinação das sementes tratadas com 0, 2 e 4 mM de sulfato de ferro foi superior a 80%, reduzindo para 40% em tratamentos com 8 e 10 mM. No pH 3,0 sementes incubadas em 0 e 2 mM de sulfato de ferro apresentaram 80% de germinação, seguido de 70% em 4 mM, e redução significativa, inferior a 10%, em sementes incubadas com 8 e 10 mM de sulfato de ferro. O pH e as concentrações de sulfato de ferro afetaram significativamente o crescimento das plântulas, volume, área, MF, MS da parte aérea e raiz sendo o efeito maior em plântulas mantidas em pH 3,0. Maior acúmulo de PAs ocorreu na parte aérea em relação à raiz, assim como verificou-se maior alteração nutricional nas raízes com o aumento na concentração de sulfato de ferro. Nas mudas micropropagadas não foi observado diferença significativa nos parâmetros de crescimento e fisiológicos, como as trocas gasosas, fluorescência da clorofila e teor de clorofila da planta. Verificou-se maior conteúdo de Spd e PAs livres totais nas folhas comparado com a raiz. Verificou-se maior alteração nutricional nas raízes com a redução na concentração dos elementos K, N, Fe e B em pH 3,0 e aumento de Cu. Já no caule observou-se menor alteração na concentração de nutrientes. Os dados mostram que as altas concentrações de ferro II e pH ácido afetaram a germinação e crescimento das plântulas de *C. fissilis*. Entretanto, para as mudas micropropagadas, a presença do ferro não afetou o crescimento.

Palavras-chave: Germinação, Micropropagação, Sulfato de ferro, Poliaminas.

ABSTRACT

SILVA, Benjamim Valentim da. M.Sc. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. February 2018. Effect of pH and iron II on the germination and growth of micropropagated plantlets of *Cedrela fissilis* (Meliaceae), a native tree threatened with extinction. Advisor: Profa. Dr^a. Claudete Santa Catarina.

The emission of solid particulate material of iron (MSPFe) in nature can contribute to the alteration of the phytophysiognomy of the Atlantic Forest and can configure an environmental impact, affecting the growth of plants. The objective of this work was to evaluate the effect of different concentrations of Iron II and pH on the germination and growth of micropropagated plantlets in *Cedrela fissilis*, analyzing their influence on morphological, physiological and biochemical parameters. For germination, seeds were treated with aqueous solution with two pHs (3.0 and 5.5) and five concentrations (0, 2, 4, 8 and 10 mM) of iron sulfate as the source of Iron II. The germination (%) was evaluated daily, and after 15 days, the content of fresh matter (MF) and dry matter (MS), polyamines (PAs) and nutrients were determined from seedlings. For the micropropagated plantlets, plantlets with 30-day of rooting in soil substrate and vermiculite (1:1; v/v) were treated with Hoagland solution containing different concentrations (0.0019; 2.5; 5; and 10 mM) of iron sulphate at pH 3.0 and 5.5. The plantlets were supplied with the treatments at intervals of 2 days, and at other days, the irrigation was supplied with distilled water. The plantlets were kept in an acclimatization room, with 16 h of light (of $22 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) at $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ for 30 days, and then, transferred to the greenhouse and maintained for 30 days, totaling 60 days of treatment. After the period of 60 days, photosynthetic parameters (gas exchange, fluorescence and relative chlorophyll

content) and analysis of FM, DM, leaf area, root area and volume, nutrient and PAs contents of the aerial part and root were performed. The germination was affected by iron sulphate and pH, with the highest reduction in seeds maintained at the highest concentrations of iron sulphate at pH 3.0 compared to pH 5.5. At pH 5.5 the germination of seeds treated with 0, 2 and 4 mM iron sulphate was higher than 80%, reducing to 40% in treatments with 8 and 10 mM. At pH 3.0, seeds incubated at 0 and 2 mM iron sulfate showed 80% germination, followed by 70% at 4 mM, and significant reduction, less than 10%, when incubated with 8 and 10 mM iron sulfate. The pH and iron sulphate concentrations significantly affected seedling growth, as the volume, area, FM, DM of shoot and root, being the effects higher in seedlings maintained at pH 3.0. A higher accumulation of PAs occurs in the aerial part in relation to roots, as well as, it was observed a higher nutritional alteration in roots with the increase in the concentrations of iron sulfate. In the micropropagated plantlets, no significant difference was observed in the parameters of growth and physiological, as gas exchange, chlorophyll fluorescence, and chlorophyll content of the plant. A higher content of Spd and total free PAs were observed in the leaves compared to roots. It was observe a higher alteration of nutrients in the roots, with a reduction in the content of the elements K, N, Fe and B, and an increase of Cu in plantlets at pH 3.0. In the stems it was observed less changes in the contents of nutrient. The data show that the higher concentrations of iron II and acid pH affected the germination and growth of *C. fissilis* seedlings. However, for micropropagated plantlets, the presence of iron does not affect its growth.

Key words: Germination, Micropropagation, Iron sulphate, Polyamines.

1. INTRODUÇÃO

O bioma Mata Atlântica ocorre na costa Atlântica brasileira do Rio Grande do Norte até o Rio Grande do Sul (Peixoto et al., 2004). Apresenta uma área original de 12,5% que corresponde a 164.432,5 km², resultando atualmente cerca de 12,5% de sua área original (Fundação SOS Mata Atlântica, 2017) Entretanto, este bioma sofreu forte ação antrópica ao longo dos anos, resultando na redução significativa de várias espécies, incluindo as florestais. Dentre as espécies arbóreas nativas destaca-se a *Cedrela fissilis* Vell. (Meliaceae), conhecida popularmente como cedro-rosa, a qual encontra-se incluída na lista vermelha de espécies ameaçadas da International Union for Conservation of Nature (IUCN) devido a sua importância econômica (IUCN, 2017).

Além do desmatamento outro fator de grande impacto ambiental é a exploração do minério de ferro e todo seu processo no manuseio do minério, logística e pelletização suspendendo partículas na forma de material sólido particulado (MSP). O MSP_{Fe} afeta as plantas ao ser depositado na superfície das folhas perturbando balanço de radiação, afetando o aquecimento foliar e danificando controle estomático (Grantz et al., 2003). O ferro quando em excesso no solo pode formar as placas de ferro na superfície da raiz, que são formadas pela precipitação desse nutriente na forma sólida, podendo causar distúrbios

nutricionais induzindo a deficiência e acumulando nutrientes (Zhang et al., 1999).

Neste sentido, destaca-se a importância da utilização de espécies nativas para a revegetação e recuperação das áreas ambientais impactadas. Assim, a identificação de espécies nativas que toleram o crescimento em áreas com elevados teores de metais pesados, como o Fe, seria de grande importância como forma de intervenção e recuperação destas áreas. Ainda não há informações suficientes para elucidar a resistência de algumas espécies, em ambientes com altas concentrações de minério de ferro. Neste sentido, estudos visando identificar espécies nativas que apresentam potencial de crescimento em ambientes com elevados teores de Fe são fundamentais para auxiliar na identificação de espécies que possam ser utilizadas para a recuperação de áreas ambientais.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Mata Atlântica

A Mata Atlântica é um dos biomas brasileiros com maior riqueza biológica e elevados níveis de endemismo, entretanto, devido à intensa degradação ambiental e efeito antrópico, este bioma está sendo um dos principais *hotspots* mundiais, ou seja, uma das prioridades para a conservação da biodiversidade em todo o mundo (Colombo & Joly, 2010; Myers et al., 2000). A intensa retirada da madeira e a utilização das áreas para a inserção de atividades agropecuárias vêm causando um grande impacto nas florestas (Sena & Florestais, 2008). Entre os anos de 2015 e 2016 o desmatamento cresceu 57,7% em um ano, sendo destruídas 290 km² de florestas, o maior em 10 anos (Fundação SOS Mata Atlântica, 2017).

A exploração dos recursos naturais de maneira não sustentável e ocupação desordenada nas áreas de mata atlântica está contribuindo para o risco extinção de espécies nativas (Dean, 1996; Myers et al., 2000; Pinto et al., 2006). Espécies florestais nativas são elementos importantes para manutenção da biodiversidade neste bioma. No entanto, com a fragmentação de seus ecossistemas, observaram-se nos últimos anos, perdas significativas da diversidade, o que levou várias espécies a ameaça de extinção, tais como a *C.*

fissilis (IUCN, 2017).

Conhecida popularmente como cedro rosa, *C. fissilis* é uma árvore de crescimento rápido e de grande importância econômica para o Brasil, principalmente para fins madeireiros, e possui potencial de atingir até 40 metros de altura (Valério et al., 2009). A produção da sua madeira tem prestígio tanto nacional como internacional, apresenta diversas finalidades como nas embarcações e na construção civil, sendo somente superada pela madeira do pinheiro-do-paraná, a *Araucaria angustifolia* (Carvalho, 1994). Entretanto, uma limitação para o plantio em escala desta espécie é a broca do cedro (*Hypsipyla grandella*), cujas larvas atacam o meristema apical da planta, induzindo assim o crescimento de ramos laterais e prejudicando o seu desenvolvimento no campo (Lorenzi, 1992). Sua propagação pode ser tanto por sementes como por estaquia e pelo cultivo *in vitro*, via micropropagação utilizando brotações chamadas de explantes que podem ser células, meristemas (Aasim et al., 2008), embriões zigóticos (Zuraida et al., 2017), segmentos foliares (Siwach & Gill, 2014), caulinares (Moura et al., 2012) e raízes (Rathore et al., 2014). Adicionalmente, estudos recentes sobre o efeito do tempo de armazenamento na emergência das plântulas e nas alterações bioquímicas de poliaminas (PAs) e carboidratos tem sido realizado para esta espécie (Sousa et al., 2016). Embora estes estudos já desenvolvidos para esta espécie, não há relatos na literatura sobre o crescimento desta espécie em áreas impactadas com metais, como Fe.

2.2. Usinas de mineração e o elemento Ferro

O crescente número de usinas do setor de mineração e beneficiamento de minério de ferro no litoral brasileiro, em especial no Estado do ES, é responsável pela emissão de diversos poluentes atmosféricos que podem comprometer a sobrevivência de espécies vegetais sensíveis ao crescimento em locais com metais pesados (Kacilda Naomi Kuki et al., 2008; Neves et al., 2009; Silva et al., 2006).

A difusão de poeira ou material sólido particulado (MSP) pelas áreas vegetacionais é fortemente favorecida pelos ventos sob a forma de aerossol sendo responsáveis pelas alterações biológicas em organismos vivos. Dentre os principais agentes poluentes se encontram o dióxido de enxofre (SO₂) e o pó de minério de ferro (Lopes et al., 2000). Suspensos na atmosfera, esses poluentes

se depositam sobre a vegetação como chuva ácida e na forma de MSP de ferro (MSP_{Fe}). O MSP_{Fe} afeta as plantas tanto por mecanismos físicos, ao perturbar do balanço de radiação, aquecimento foliar e danificação do controle estomático; quanto por mecanismos químicos pela lixiviação de nutrientes das folhas, efeito do pH e estado nutricional (Grantz et al., 2003). Neste sentido, os efeitos desta forma de poluição em elevados teores podem afetar significativamente as comunidades vegetais expostas, e causar modificações na estrutura destas (Wong et al., 1978).

O ferro (Fe) é um elemento químico com número atômico 26 e massa atômica 55,85 u. Está presente nas rochas, solos, águas, organismos e aerossóis (Reddy & DeLaune, 2008), sendo o quarto elemento mais abundante na crosta terrestre (Gurzau et al., 2003). Cerca de 4,2% da litosfera são constituídos por Fe, sendo hematita, magnetita, goetita e siderita os principais minerais que contêm Fe. Embora abundante na crosta terrestre, este elemento está presente no solo na forma oxidada Fe^{3+} com baixa solubilidade em água. A forma bivalente (Fe^{2+}) é a forma mais disponível para as plantas, já que é mais solúvel (Kim & Guerinot, 2007).

O Fe é um micronutriente essencial para o crescimento e desenvolvimento das plantas (Kerbaudy, 2004), estando também relacionado a importantes funções metabólicas, como biossíntese de clorofila e de diversas proteínas (Marschner, 2011) e contribui na ocorrência de diversos processos na fotossíntese, síntese de DNA e de hormônios (Marschner, 2011).

A translocação do Fe no tecido vegetal tem sido considerada baixa (Ghaly et al., 2008) devido à baixa remobilização a partir das folhas mais velhas para as folhas mais novas (Bauer & Hell, 2006). São inúmeros os fatores que interferem na disponibilidade de metais para as plantas, como pH, nível de oxigênio, teor de matéria orgânica, quantidade de argila e potencial redox (Pierangeli et al., 2001). O excesso de Fe pode ainda danificar lipídios, proteínas e DNA pela formação de radicais hidroxila na reação de Feton (Connolly & Guerinot, 2002).

Em algumas plantas a absorção de Fe é altamente regulada para impedir seu acúmulo em excesso (Kim & Guerinot, 2007; Yoshihara et al., 2010). A proteção contra a toxidez por este elemento na planta podem envolver mecanismos enzimáticos e não-enzimáticos (Fang et al., 2001). Os mecanismos enzimáticos estão relacionados com o aumento na atividade das enzimas

antioxidantes (superóxido dismutase, catalase e ascorbato peroxidase), as quais agem na supressão de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Becana et al., 1998; J.-F. Briat & Lebrun, 1999). Os mecanismos não-enzimáticos estão associados com a produção de moléculas, como carotenoides, que agem também na eliminação de EROs (Edge et al., 1997; Krinsky & Yeum, 2003; Polyakov et al., 2001; Smirnoff, 2005). Na planta pode ocorrer ainda a compartimentalização do Fe em organelas, como vacúolos e plastídios, e também em ferritina, uma proteína especializada que mantém a homeostase do Fe nas células (J.-F. Briat et al., 2010; Majerus et al., 2009; Murgia et al., 2007).

Em solos com perfil poroso o Fe é encontrado na forma insolúvel Fe^{3+} , pouco disponível para as plantas. Em lugares que haja extração do minério de Fe, beneficiamento ou solos alagados devido a alta precipitação e pH baixo, podem aumentar a disponibilidade do Fe para Fe^{2+} solúvel, tornando-se tóxico para as plantas (Audebert & Fofana, 2009; Sahrawat, 2005). As concentrações normais de Fe nas plantas variam entre 30 e 300 $\mu\text{g g}^{-1}$ de seu peso seco. Em geral, concentrações acima de 500 $\mu\text{g g}^{-1}$ são consideradas tóxicas (Pugh et al., 2002), sendo esta concentração dependente da espécie, seu estado fisiológico e as condições de crescimento. Em ambientes com disponibilidade em excesso de Fe, as plantas absorvem e armazenam em seus tecidos, e em nível crítico de toxicidade surgem os sintomas de clorose, com folhas bronzeadas e raízes escuras em espécies de arroz (Chatterjee et al., 2006; Siqueira-Silva et al., 2012). Na cultura do arroz foram observados sintomas de toxicidade nas folhas, como manchas castanhas e raízes com crescimento reduzido, com coloração marrom escuro e atrofiado, devido à alta disponibilidade desse elemento em solos alagados (Becker & Asch, 2005; De Dorlodot et al., 2005). Adicionalmente, dependendo do grau de toxidez ao Fe, pode ser induzida nas plantas a formação de EROs, ocasionando a degradação da membrana do tilacóide, destruição dos pigmentos fotossintético e morte celular (Dobermann & Fairhurst, 2000; Møller et al., 2007).

2.3. Metais pesados e seus efeitos na germinação

A germinação tem grande importância no ciclo de vida das plantas, pois através deste processo a semente reativa o metabolismo celular e resulta no crescimento do embrião, formando a planta completa (Nonogaki et al., 2010;

Obroucheva et al., 2006). O processo germinativo possui várias fases. Na fase I ocorre a embebição e inicia o processo respiratório e síntese de proteína usando mRNAs existentes. Na fase II além da síntese de proteínas e reparação do DNA, ocorrem várias alterações celulares e bioquímicas até completar a germinação, quando da emissão da radícula (Bewley, 1997).

A respiração é um dos eventos importantes nos estágios iniciais da germinação de sementes (Bewley, 1997; MOROHASHI, 1980; Nawa & Asahi, 1971). Estudos mostram que os metais pesados afetam a germinação em algumas espécie, como ervilha (*Pisum sativum*), causando alterações em processos respiratórios (Smiri et al., 2009) e limitando a disponibilidade dos nutrientes (Mihoub et al., 2005; Rahoui et al., 2010; Sfaxi-Bousbih et al., 2010). Em estudos com metais pesados foi observado que a presença de cádmio (Cd) afeta os processos respiratórios na germinação de *P. sativum* cv. Bonneville, ocorrendo o aumento nas concentrações desse metal e redução na respiração da semente (Chugh & Sawhney, 1996). Esta redução ocorre devido à interferência nas atividades enzimáticas do ciclo de Krebs e na cadeia de transporte de elétrons conforme demonstrado em cotilédones de sementes de ervilha durante a germinação (Bansal & Sharma, 2000; Bansal et al., 2002).

Embora estudos relatam o efeito de metais pesados, como Cd, níquel (Ni) e chumbo (Pb), sobre a concentração de nutrientes em tecidos da raiz, caule e folhas de mudas de origem seminífera de *C. fissilis* (Paiva et al., 2002a), pouco se sabe sobre a influência do Fe na germinação de sementes em espécies arbóreas nativas.

2.4. Metais pesados e os efeitos no crescimento de mudas micropropagadas

Técnicas biotecnológicas, como a micropropagação, podem representar uma estratégia alternativa às convencionais, como via seminífera e estaquia, para propagar espécies arbóreas ameaçadas de extinção (Aragão et al., 2016; Pence, 2010; Pijut et al., 2012; Pijut et al., 2011; Santa-Catarina et al., 2006). Em especial, destacam-se as espécies que apresentam dificuldades de propagação por métodos convencionais como a estaquia, representando um grande potencial de aplicação em programas de conservação, reflorestamento e recuperação de áreas degradadas e contaminadas.

A regeneração de brotações na micropropagação pode ocorrer de forma indireta e direta, sendo a direta a melhor resposta para a propagação clonal por não haver a formação de calo, o qual pode resultar em variação somaclonal (Giri et al., 2004). Para espécies florestais é comum utilizar a organogênese via direta, usando-se como explantes, segmentos nodais apicais e cotiledonares para a indução de brotações *in vitro* (Pijut et al., 2012). Um sistema de propagação *in vitro* para *C. fissilis* foi estabelecido identificando as melhores condições para cada etapa do processo (Costa Nunes et al., 2002). Estudos recentes em *C. fissilis* mostram um aumento do número de brotações provenientes de segmentos nodais apicais e comprimento de brotos de segmentos nodais cotiledonares com a utilização da citocinina benziladenina (BA), o qual pode ser decorrente do aumento no conteúdo endógeno da poliamina (PA) putrescina (Put) (Aragão et al., 2016). A adição de PAs exógenas em especial Put induziu um maior comprimento de brotações e alterou proteína, que poderia estar relacionada com o desenvolvimento de brotações nessa espécie (Aragão et al., 2017). Adicionalmente, o enraizamento das brotações micropropagadas, etapa final da micropropagação desta espécie, foi estabelecido *ex vitro* com a transferência destas brotações para substrato florestal e vermiculita (1:1, v/v), obtendo-se alta taxa de enraizamento sem o uso de auxinas (Ribeiro, 2015). Desta forma, todas as etapas da propagação *in vitro* encontram-se bem estabelecidas para esta espécie, sendo possível a obtenção de mudas.

Alguns estudos foram realizados avaliando o efeito de doses crescentes de alguns metais pesados (Cd, Ni e Pb) no crescimento de mudas de origem seminífera de *C. fissilis* e de ipê-roxo (*Tabebuia impetiginosa*), verificando efeitos na translocação de nutrientes (Paiva et al., 2002a). Porém, não há relatos do efeito de metais pesados, como o Fe, na aclimatização e crescimento de mudas micropropagadas de *C. fissilis*.

2.5. Estudos fisiológicos e bioquímicos durante a germinação e crescimento de mudas micropropagadas relacionados com o Ferro

2.5.1. Fe e alterações na concentração de nutrientes

O excesso de Fe pode causar desbalanços nutricionais nas plantas induzindo deficiência de alguns minerais essenciais tais como P, Ca, K, Mg e Zn

(Audebert & Fofana, 2009). Grande parte das alterações nutricionais está relacionada à formação da chamada “placa de ferro” na superfície radicular (Chen & Harmon, 2006; St-Cyr & Campbell, 1996). Essas placas, constituídas de óxidos e hidróxidos de ferro, apresentam elevada capacidade para adsorver diferentes minerais atuando como barreira à absorção de determinados nutrientes (H. Liu et al., 2008; Zhang et al., 1999). Por outro lado, sugere-se que essas placas possam atuar como reservatório de alguns nutrientes, aumentando a absorção desses elementos durante períodos de deficiência no meio de crescimento (Zhang et al., 1999).

De forma geral, o excesso de metais pesados, como Fe, podem limitar a disponibilidade de alguns nutrientes e favorecer a absorção de outros. Trabalhos realizados por (Siqueira-Silva et al., 2012) com espécies de restinga mostram que o excesso de Fe favorece maior quantidade de Zn adsorvido na placa de ferro para assimilação pela raiz em *Canavalia rosea* e redução na translocação de N para a parte aérea em *Ipomoea pes-caprae*. Análises do teor de nutrientes em tecidos da raiz, caule e folhas de mudas de origem semínifera de *C. fissilis* em exposição a concentrações de Ni mostraram que a aplicação deste elemento aumentou o teor de P, não afetou os teores de K e S e reduziu os teores de Ca e Mg nos tecidos (Paiva et al., 2002b). Entretanto, análise do teor de nutrientes sob efeitos de doses de Fe ainda não foram realizados para esta espécie a partir de mudas micropropagadas.

2.5.2. Fe e seu efeito nos parâmetros fisiológicos

O Fe é um elemento essencial nos tecidos fotossintéticos como um constituinte dos complexos envolvidos no transporte de elétrons e seu papel central em reações redox (Zhang et al., 1999). Também promove a integridade estrutural dos centros de reação fotossintética e das subunidades do complexo de coleta de luz (LHC) (Guerinot & Yi, 1994; Msilini et al., 2011). No entanto, em excesso este elemento se torna tóxico, causando a superprodução de EROs que podem induzir danos no metabolismo e estrutura celular nos vegetais (Connolly & Guerinot, 2002; Schutzendubel & Polle, 2002).

O excesso de Fe também leva a alterações na fotossíntese pela redução na concentração de clorofila, bem como nas reações luminosas da fotossíntese

resultando em redução na taxa de assimilação líquida de CO₂ e, por consequência, o declínio do crescimento da planta (Adamski et al., 2011; Chatterjee et al., 2006; Mehraban et al., 2008). Nas plantas, aproximadamente 80% do Fe é encontrado nas células fotossintéticas (Hänsch & Mendel, 2009), ocorrendo em vários complexos do aparato fotossintético, sendo dois ou três átomos de Fe nas moléculas diretamente relacionadas com fotossistema II (PSII), 12 átomos de Fe no fotossistema I (PSI), cinco átomos de Fe no complexo citocromo b6f, e dois átomos de Fe na molécula da ferredoxina (Varotto et al., 2002). Desta forma, o Fe em excesso, afeta a biossíntese de pigmentos cloroplastídicos (Msilini et al., 2011).

Neste sentido, as variáveis fotossintéticas podem proporcionar uma medição quantitativa, rápida, não invasiva e não destrutiva de alterações no metabolismo das plantas antes da detecção de efeitos e sintomas visuais da fitotoxicidade. Em plantas de *Beta vulgaris* crescidas sob o excesso de Fe foram observadas alterações na estrutura do cloroplasto e redução do número de moléculas do PSI e citocromo b6f por unidade de área, promovendo assim alterações no transporte de elétrons, o que causa redução na taxa de assimilação líquida de CO₂ e uma diminuição da fixação de carbono (Mishra & Dubey, 2005).

A fluorescência da clorofila *a* é emitida pelo fotossistema II (PSII) e pelo sistema coletor de luz do PSII (denominado LHCI). As alterações na emissão da fluorescência podem revelar comprometimentos no processo fotossintético (Strasser et al., 2000). Desse modo, o estudo da fluorescência da clorofila *a* possibilita a obtenção de importantes informações sobre a relação entre estrutura e atividade do PSII, do centro de reação (RC) e dos LHCs (Smit et al., 2009) e constitui-se em um modo de dissipação do excesso de energia (Mohammed et al., 2003; Taiz & Zeiger, 2006). Plantas de *Eugenia uniflora* expostas às concentrações de 1 e 2 mM de Fe apresentaram decréscimos significativos nos teores totais de pigmentos de clorofila *a* e de carotenoides (Jucoski et al., 2016). Embora a influência do Fe nos parâmetros fisiológicos tenha sido mostrado para algumas espécies, ainda não foi descrito estudos com esta abordagem para a germinação e mudas micropropagadas de *C. fissilis*.

2.5.3. Poliaminas (PAs) e sua relação com estresse abiótico

As PAs são moléculas alifáticas, contendo aminas carregadas

positivamente, sendo a Put, espermidina (Spd) e espermina (Spm) as principais PAs encontradas nas plantas superiores, ocorrendo na forma livre ou conjugada com ácidos fenólicos e moléculas de baixo peso molecular (Bouchereau et al., 1999; Kuznetsov et al., 2006).

As PAs atuam na regulação de vários processos, como a biossíntese de macromoléculas, divisão e diferenciação celular, organogênese e embriogênese (Aragão et al., 2017; Bouchereau et al., 1999; Kusano et al., 2008; Minocha et al., 1999; Santa-Catarina et al., 2006). Além destes, as PAs estão relacionadas a respostas a estresses ambientais, tais como deficiências minerais, estresse osmótico e salino, e estresses abióticos (Kusano et al., 2008; Perez-Amador et al., 2002). Estudos recentes também mostram o papel das PAs associadas ao potencial de fitorremediação ao Ni e Fe em híbridos de *Amaranthus*, verificando-se que em concentrações elevadas de Ni as plantas sintetizaram compostos orgânicos com ação protetora, como as PAs, acumulando biomassa em condições severa de estresse (Shevyakova et al., 2011). Tomitori et al. (1999) descreveram uma proteína de membrana que transporta PAs para dentro do vacúolo, podendo estas atuar na função de redução da toxicidade do Ni. Mais de 75% de Fe na raiz é retido na parede celular (Bienfait *et al.* 1985), principalmente na hemicelulose (Lei et al., 2014), fornecendo o nutriente quando estiver limitado. Ainda, a PA Put promoveu uma diminuição da quantidade de Fe ligado à parede das células radiculares, especialmente à hemicelulose, resultando em aumento da concentração de Fe solúvel na raiz e brotação, aliviando assim a clorose induzida por deficiência de Fe em *Arabidopsis* (Zhu et al., 2016).

Embora estudos mostrem a influência das PAs em plantas sob condições de Fe, ainda não foram realizados estudos verificando o papel destes compostos durante a germinação e crescimento de mudas micropropagadas de *C. fissilis*. Neste sentido, estudos relacionando a influência do ferro sobre o crescimento de mudas micropropagadas e na germinação de sementes de arbóreas nativas, e seus efeitos nas alterações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas são importantes tanto para estudos básicos de mecanismos de tolerância, bem como para a identificação de espécies arbóreas que toleram o crescimento em condições ambientais com níveis elevados deste elemento químico que possam ser utilizadas em futuros estudos de recuperação de áreas impactadas.

3. OBJETIVO

3.1. Objetivo geral

O objetivo geral deste estudo foi avaliar o efeito de diferentes concentrações de Ferro II e pH na germinação e no crescimento de mudas micropropagadas de *C. fissilis*, analisando sua influência sobre os parâmetros morfológicos, fisiológicos e bioquímicos.

3.2. Objetivos específicos:

- Avaliar o efeito de diferentes concentrações de ferro II e pH na percentagem e a velocidade de germinação;
- Avaliar o efeito de diferentes concentrações de ferro II e pH sobre o crescimento de mudas micropropagadas da espécie alvo;
- Determinar o efeito do ferro II e pH na matéria fresca (MF) e seca (MS), concentração endógeno de ferro, nutrientes e PAs durante a germinação e crescimento das mudas;
- Avaliar os efeitos de ferro II sobre parâmetros fotossintéticos em mudas micropropagadas;

- Identificar se a espécie apresenta tolerância ao crescimento em ambientes com elevadas concentrações de ferro II.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Material vegetal

Para o experimento de efeito do ferro II e pH sobre a germinação foram utilizadas sementes de *C. fissilis*, obtidas do viveiro Caiçara localizado em Brejo Alegre-SP, Para os estudos do efeito de ferro II sobre o crescimento de mudas micropropagadas foram utilizadas mudas de *C. fissilis* obtidas a partir de brotações propagadas *in vitro* e enraizadas *ex vitro*.

4.2. Efeito do ferro e pH na germinação de sementes

Para testar o efeito do pH e ferro II na germinação, inicialmente as sementes tiveram a superfície desinfestadas. Para isso, foram colocadas por 20 min em sanitária comercial (Qboa®, Osasco, Brasil) 100% (2 a 2,5 de cloreto ativo), acrescida de fungicida (Cercobim 700 WP, São Paulo, Brasil) na concentração de 0,2 mg 100 mL⁻¹. Em seguida, as sementes foram lavadas com água destilada deionizada e autoclavada por 3 vezes em câmara de fluxo laminar, e inoculadas em placas de Petri, previamente autoclavada, contendo duas folhas de papel de germinação. Na placa de Petri foram adicionados 15 mL de solução contendo diferentes concentrações de sulfato de ferro (0,019; 2; 4; 8 e 10 mM) e dois pH (3,0 e 5,5). As concentrações de sulfato de ferro foram dissolvidas em

água destilada, e o pH foi ajustado para 3,0 e 5,5 utilizando HCl 1N e KOH 1N. Após quatro dias de incubação foram adicionados 3,5 mL da respectiva solução em cada placa de Petri.

Após a inoculação das sementes, as placas de Petri foram incubadas em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 h de luz, a 25 °C. O experimento foi realizado por delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 x 5, com dois pH e cinco concentrações de sulfato de ferro. Foram utilizadas 4 repetições de 50 sementes cada, totalizando 200 sementes/tratamento. A germinação (%) foi avaliada diariamente. Após 15 dias, foi avaliado a matéria fresca (MF) e seca (MS) da raiz e parte aérea, e a área radicular. Adicionalmente, amostras da parte aérea e da raiz foram coletadas para análise de PAs (200 de MF cada amostra, em triplicata) e nutrientes (100 mg de MS cada amostra, em triplicata).

4.3. Efeito do ferro e pH no crescimento das mudas micropropagadas

Para analisar o efeito do Ferro e pH no crescimento das mudas micropropagadas, foram realizadas várias etapas para a obtenção das mudas, germinação *in vitro*, obtenção das brotações e enraizamento *ex vitro* das brotações.

4.3.1. Germinação *in vitro*

Sementes *C. fissilis* foram submetidas a uma etapa de desinfestação de acordo com a metodologia descrita por Santa-Catarina et al. (2001) com algumas modificações. As sementes foram lavadas com água (250 mL) contendo 3 gotas de detergente neutro (Limpol Bombril®, São Bernardo do Campo, Brasil) e lavadas 3 vezes com água destilada. Em seguida, as sementes foram imersas em álcool 70 % por 1 min, seguido de água sanitária comercial (Qboa®) 100%, contendo de 2,0 a 2,5 de cloreto ativo acrescida de fungicida Cercobim 700 WP (0,2 mg 100 mL⁻¹) por 1 h 30 min e lavadas 10 vezes com água destilada autoclavada em câmara de fluxo laminar.

Após assepsia, as sementes foram inoculadas em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio de cultura MS (Murashige e Skoog, 1962),

suplementados com sacarose (20 g L⁻¹) e fitagel (2 g L⁻¹), com o pH do meio de cultura ajustado para 5,7, e autoclavados a 121°C, a 1,5 atm por 15 min.

Após a inoculação, as sementes foram mantidas em sala de cultura com fotoperíodo de 16 h de luz, intensidade luminosa de 22 μmol m² s⁻¹ e temperatura de 25±2 °C.

4.3.2. Obtenção das brotações *in vitro*

Plântulas com 60 dias de idade foram utilizadas como fonte de explantes (segmentos nodais) para a indução de brotações. Segmentos nodais foram inoculados em meio de cultura MS suplementado com sacarose (20 g L⁻¹), fitagel (2.0 g L⁻¹) e 2,5 μM de benziladenina (BA), de acordo com a metodologia proposta por Nunes et al. (2002). O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,7 e em seguida autoclavado a 121 °C, a 1,5 atm por 15 min. Após a transferência, os explantes foram incubados por 45 dias em sala de cultura, com fotoperíodo de 16 h de luz, intensidade luminosa de 22 μmol m² s⁻¹, a 25±2 °C.

4.3.3. Enraizamento *ex vitro*

Brotações com 45 dias de incubação *in vitro* foram obtidas e usadas para indução do enraizamento *ex vitro*. Para tanto, as brotações (± 2 cm) foram seccionadas e transferidas para copos plásticos (200 mL) contendo substrato florestal e vermiculita (1:1; v/v) para induzir o enraizamento e aclimatização das mudas simultaneamente. As brotações foram transferidas para bandejas plásticas, regadas com água destilada autoclavada (mantendo uma lâmina de água na base da bandeja) e coberta com filme plástico PVC para evitar a perda excessiva de água. As bandejas foram mantidas em sala de enraizamento, por 45 dias em sala de enraizamento, com fotoperíodo de 16 h de luz, intensidade luminosa de 22 μmol m² s⁻¹ e temperatura de 25±2 °C. Após 7 dias, foram realizadas perfurações no filme PVC para permitir a redução da umidade relativa interna na bandeja, e aos 20 dias, foi retirado o filme PVC, permitindo a aclimatização das mudas. Aos 30 dias, as mudas micropropagadas foram utilizadas no experimento.

4.3.4. Tratamento com as diferentes concentrações de Fe e pH

Para realizar o experimento foram utilizadas mudas enraizadas (com 30 dias após a indução do enraizamento). Estas mudas foram tratadas com diferentes concentrações (0; 2,5; 5 e 10 mM) de sulfato de ferro em dois pH (3,0 e 5,5), totalizando 8 tratamentos. As diferentes concentrações de sulfato de ferro foram preparadas com solução de Hoagland meia força (Hoagland & Arnon, 1950), e ajustados para os diferentes pHs utilizados. Os diferentes tratamentos foram fornecidos por irrigação na superfície do substrato próximo ao caule da muda. Cada copo plástico contendo a muda foi colocada sobre pratos de plástico. A irrigação com diferentes tratamentos foi realizada em intervalos de dois dias, durante 60 dias. Nos dias em que não houve o fornecimento das doses de sulfato de ferro foi fornecida irrigação com água destilada.

Inicialmente estas mudas foram mantidas por 30 dias em sala de enraizamento com fotoperíodo de 16 h de luz, intensidade luminosa de $22 \mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$ e temperatura de $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$. Posteriormente, foram transferidas para casa de vegetação e mantidas por 30 dias, totalizando 60 dias de tratamento.

O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 2×4 , com dois pH (3,0 e 5,5) e quatro concentrações de sulfato de ferro. Foram utilizadas 15 repetições por tratamento, sendo considerado cada planta uma repetição.

Aos 60 dias foram analisados a altura da parte aérea, diâmetro do caule, área radicular e foliar, MF e MS da raiz e parte aérea, e os parâmetros fotossintéticos. Adicionalmente, amostras da parte aérea e da raiz foram coletadas para análise de PAs (200 de MF cada amostra, em triplicata) e nutrientes (100 mg de MS cada amostra, em triplicata).

4.4. Determinação da MF e MS

Foi determinada a MF e MS da parte aérea e radicular das plântulas aos 15 dias de germinação a partir de 4 repetições por tratamento, cada repetição constituída por 5 plântulas. Também foi determinada a MF e MS das folhas, caule e raiz, separadamente, das mudas micropropagadas aos 60 dias nos diferentes tratamentos, utilizando-se 4 mudas por tratamento.

A MF foi obtida por pesagem em balança de precisão, e em seguida, as amostras foram acondicionadas em sacos de papel e levadas para secar em

estufa com circulação de ar quente forçado, a 70°C por 72 h. Após esse período as amostras foram pesadas novamente em balança de precisão, obtendo-se a MS.

4.5. Análise de parâmetros biométricos

4.5.1. Determinação da área radicular e da parte aérea

A área radicular foi determinada em plântulas após 15 dias de germinação nos diferentes tratamentos. Para as mudas micropropagadas foram determinadas a área, volume e diâmetro radicular e a área da parte aérea (folha e caule separadamente) aos 60 dias de incubação nos diferentes tratamentos com Ferro e pH.

A área radicular foi analisada utilizando o Software WinRHIZO Tron MF (Instruments Regents Inc, Québec, Canadá) e a área foliar foi determinada utilizando o integrador óptico de área foliar LI-3100 (LI-COR, Lincoln, USA).

Para avaliar a área radicular nas plântulas germinadas, as raízes das plântulas com 15 dias foram coletadas, separadas e colocadas em cuba de acrílico transparente com água. Em seguida, as raízes foram escaneadas para obtenção da área utilizando o Software Winrhizo. Foram utilizadas 4 repetições por tratamento, e cada repetição foi constituída por 5 plântulas, totalizando 20 plântulas por tratamento.

Para determinar a área, volume e diâmetro radicular das mudas micropropagadas sob os diferentes tratamentos com sulfato de ferro foi utilizado o Software "Winrhizo". Para tanto, as raízes das mudas foram lavadas cuidadosamente em água corrente para retirar o excesso do substrato. Em seguida, foram colocadas em cuba de acrílico transparente com água, e escaneadas para obtenção da área, volume e diâmetro de cada muda. A determinação da área foliar da parte aérea foi realizada utilizando o integrador óptico de área foliar (LI-3100). Para tanto, a parte aérea foi colocada na esteira rolante e escaneada as folhas e caules, obtendo-se a área de cada planta. As análises foram determinadas a partir de 4 mudas por tratamento.

4.5.2. Determinação da altura e diâmetro das mudas micropropagadas

A determinação da altura da parte aérea e diâmetro do caule foi realizada em mudas micropropagadas aos 60 dias de incubação nos diferentes tratamentos, utilizando-se um paquímetro. Foram analisadas 15 repetições por tratamento.

4.5.3. Determinação de parâmetros fotossintéticos das mudas micropropagadas

Foram determinados os parâmetros fotossintéticos relativos a trocas gasosas, fluorescência da clorofila e estimativa do teor de clorofila em mudas micropropagadas aos 60 dias de tratamento com diferentes concentrações de Fe e dois pH.

A determinação das trocas gasosas foi realizada obtendo-se a assimilação fotossintética de CO₂ (A), a condutância estomática (g_s), a transpiração instantânea (E), carbono interno (C_i) em folíolos da região mediana (3 ou 4^o folíolo) da terceira folha aberta do ápice para a base das mudas micropropagadas, utilizando o Sistema Portátil de Medição das Trocas Gasosas (IRGA), modelo LI-6400® (LI-COR, Lincoln, NE, USA). Na avaliação das plantas foi utilizada uma luz artificial (sistema acoplado ao IRGA (*Infrared gas analyser*), com *leds* azuis e vermelhos com intensidade de 500 μmol m⁻² s⁻¹. As análises foram realizadas em 4 plantas por tratamento.

A determinação da fluorescência da clorofila *a* foi realizada utilizando o fluorômetro portátil (Pocket PEA – Plant Efficiency Analyser, Hansatech, UK). Antes de proceder a leitura, cliques que acompanham o fluorômetro foram colocados na parte central de folíolos (3 ou 4^o folíolo) da região mediana da terceira folha aberta, do ápice para a base, das mudas micropropagadas. Após 30 min, foi emitido um pulso de luz saturante por 1 s, de 3.500 μmol m⁻² s⁻¹, sendo registrados os valores da fluorescência inicial (F₀), fluorescência máxima (F_m) e a eficiência fotoquímica (F_v/F_m). Foram realizadas quatro leituras por tratamento para cada muda, sendo utilizada 4 mudas micropropagadas.

A estimativa do teor relativo de clorofila foi realizada utilizando o medidor portátil de clorofila SPAD-502 (Konica Minolta Inc, Toquio, Japan) na mesma região foliar descrita para a determinação da fluorescência da clorofila. Foram

realizadas quatro leituras por tratamento para cada muda, sendo utilizada 4 mudas micropropagadas por tratamento.

4.6. Determinação de PAs livres

A metodologia para a determinação de PAs livres foi baseada naquela descrita por Santa-Catarina *et al.*, (2006), em amostras da parte aérea e da raiz (200 mg de MF cada, em triplicata) tanto para as plântulas germinadas quanto para as mudas micropropagadas. As amostras foram maceradas com 1,6 ml de ácido perclórico 5% (v/v), e mantidas no gelo por 1 h, sendo posteriormente centrifugadas a 16.000 x g por 20 min, a 4 °C, obtendo-se o sobrenadante que contém as PAs livres. As PAs livres foi derivatizadas, misturando-se 40 µL da amostra contendo PAs, 20 µL de 1,7–diaminoheptano (DAH) utilizado como padrão interno, 50 µL de solução saturada de carbonato de sódio (NaHCO₃) e 100 µL de cloreto de dansil (5 mg mL⁻¹ em acetona). Após a homogeneização, as amostras foram incubadas no escuro por 50 min, a 70 °C. O excesso de cloreto de dansil foi convertido em dansil-prolina adicionando-se 25 µL de prolina (100 mg mL⁻¹) com posterior incubação por 30 min no escuro, à temperatura ambiente. Em seguida, as PAs derivatizadas foram particionadas com 200 µL de tolueno, e a fase apolar (tolueno), que contém as PAs, foi coletada (175 µL), seca sob centrifuga a vácuo aquecida a 40°C, e ressuspensa em 175 µL de acetonitrila.

A identificação e quantificação das PAs foi realizada utilizando-se HPLC, com coluna C18 de fase reversa (Shimadzu Shim-pack CLC ODS). Acetonitrila absoluta e acetonitrila 10% em água (pH 3,5 ajustado com HCL 1N) foram utilizadas como solventes. A mudança na proporção de acetonitrila absoluta em relação à acetonitrila 10% definiu o gradiente de corrida. O gradiente de acetonitrila absoluta foi programado para 65%, durante os primeiros 11 min, de 65 a 100% entre 11 e 25 min, e 100% até 35 min com fluxo de 1 mL min⁻¹, a 40 °C. O detector de fluorescência foi ajustado para excitação em 340 nm e emissão em 510 nm. Foram injetados 20 µL da amostra derivatizada com cloreto de dansil. As áreas e tempos de retenção de cada PAs foram avaliados por comparação com as PAs com concentrações conhecidas de Put, Spd e Spm.

4.7. Determinação de nutrientes

A determinação de nutrientes foi realizada em parte aérea e radicular de

plântulas germinadas e mudas micropropagadas.

Para determinação dos teores de P, K, Ca, Mg, S, Fe, Zn, Mn, Cu e B foram utilizadas amostras em triplicata (100 mg de MS cada amostra) da parte aérea e raiz, secas e moídas. Estes elementos foram quantificados simultaneamente por espectrômetro de emissão ótica com plasma de argônio indutivamente acoplado ICP-OES (Horiba Scientific, Edison, USA), após digestão com HNO₃ concentrado e H₂O₂, em sistema de digestão aberta (Peters, 2005).

Para a determinação do teor de N, também foram utilizadas amostras em triplicata (100 mg de MS cada amostra) da parte aérea e da raiz, secas e moídas, e submetidas à digestão sulfúrica baseada no método de Nessler (Jackson, 1965).

4.8. Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e ao teste de separação de médias SNK (5%) usando o programa estatístico Asistat.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Efeito do ferro e pH na germinação de sementes

5.1.1. Determinação da germinação

A germinação, considerando a emissão da radícula, foi observada no quinto dia após a embebição das sementes nos diferentes tratamentos, e estabilizou entre o oitavo e nono dia de embebição (Figura 1).

Em sementes incubadas em pH 5,5 observou-se nos tratamentos 0 (controle), 2 e 4 mM de sulfato de ferro valores de germinação acima de 80%, enquanto os tratamentos com 8 e 10 mM reduziram a germinação, com valores abaixo de 40% (Figura 1A). No pH 3,0 verificou-se que os tratamentos 0 (controle) e 2 mM de sulfato de ferro atingiram 80% de germinação, seguido de 70% para as sementes em 4 mM de sulfato de ferro, e abaixo de 10% de germinação nos tratamentos com 8 e 10 mM de sulfato de ferro (Figura 1B).

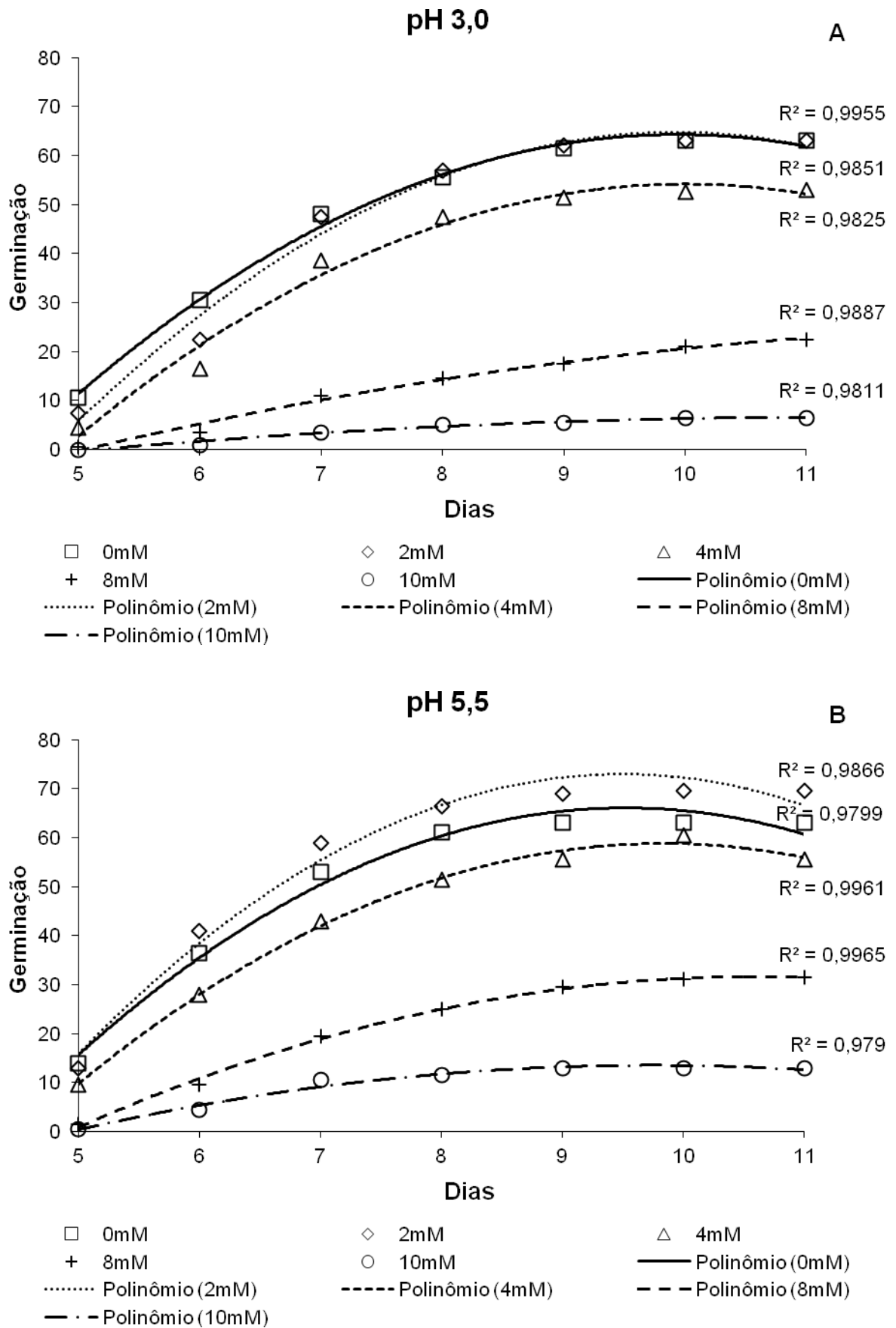


Figura 1. Efeito do efeito de diferentes concentrações de sulfato de ferro (0, 2, 4, 8 e 10 mM) em pH 3,0 (A) e 5,5 (B) sobre a germinação de sementes de *Cedrela fissilis*. (n = 4; CV= 20,11%).

É descrito na literatura que em ambientes ácidos, os metais pesados se tornam mais disponível para as plantas, sendo absorvido com maior facilidade (Grantz et al., 2003). As maiores concentrações de sulfato de ferro afetaram a germinação das sementes de *C. fissilis*, sugerindo um efeito tóxico deste nutriente, o qual foi mais intenso no pH 3,0. Dessa forma, com o aumento constante das concentrações de sulfato de ferro utilizadas, mais severo o seu efeito sobre a germinação das sementes (Figura 1). Alguns estudos relacionados com excesso de ferro e cobre apresentaram também efeitos inibitórios na germinação de sementes de *Triticum aestivum* L. somente para os tratamentos com Cu utilizando 500 μM , no tratamento com ferro não inibiu a germinação (Li et al., 2012). Mihoub et al. (2005) sugerem que a redução da germinação de sementes em *Pisum sativum* L. quando submetidas a condições de estresse por metais usando cádmio e cobre não deve ser considerado um processo tolerante ou resistente aos metais pesados, e sim uma resposta ao acúmulo gradativo após o início da embebição, induzindo assim falhas no processo de mobilização das reservas nos cotilédones e inibição da atividade da alfa amilase.

5.1.2. Análises biométricas

Verificou-se que o pH e as concentrações de sulfato de ferro afetaram o crescimento da raiz das plântulas germinadas (Figura 2A), sendo observada uma redução no tamanho da raiz com o aumento nas concentrações de ferro utilizadas. Esta redução foi maior para as plântulas mantidas em pH 3,0 (Figura 2), sugerindo um maior efeito tóxico nesta condição, assim como afetou significativamente a germinação (Figura 1). É mostrado na literatura que a raiz, por receber os primeiros contatos com as elevadas concentrações de sulfato de ferro, sofre redução do comprimento decorrente da toxicidade desse elemento (Kabir e Iqbal, 2008). O elemento ferro em excesso pode alterar o metabolismo da plântula, como a redução da atividade da alfa amilase em plântulas de ervilha, resultando conseqüentemente em redução no comprimento de raiz (Mihoub et al., 2005). Com a redução da atividade da alfa amilase induzida pelo excesso de ferro foi verificado na presença de grãos de amido na radícula do embrião de ervilha (Davis, 1977). Além do estresse oxidativo, o excesso de ferro pode induzir

ainda a geração de radicais hidroxila, os quais podem danificar a membrana lipídica e proteínas através da reação Fenton (Connolly & Guerinot, 2002). Li et al. (2012) sugerem que a redução no crescimento de raízes de *T. aestivum* sob excesso de cloreto férrico (500 μM) pode estar relacionado à produção de espécies reativas de oxigênio e H_2O_2 . Assim, os danos oxidativos, as alterações metabólicas e a redução na atividade de enzimas importantes, podem comprometer o crescimento das plântulas com o aumento da toxicidade dos metais, como o ferro em excesso.

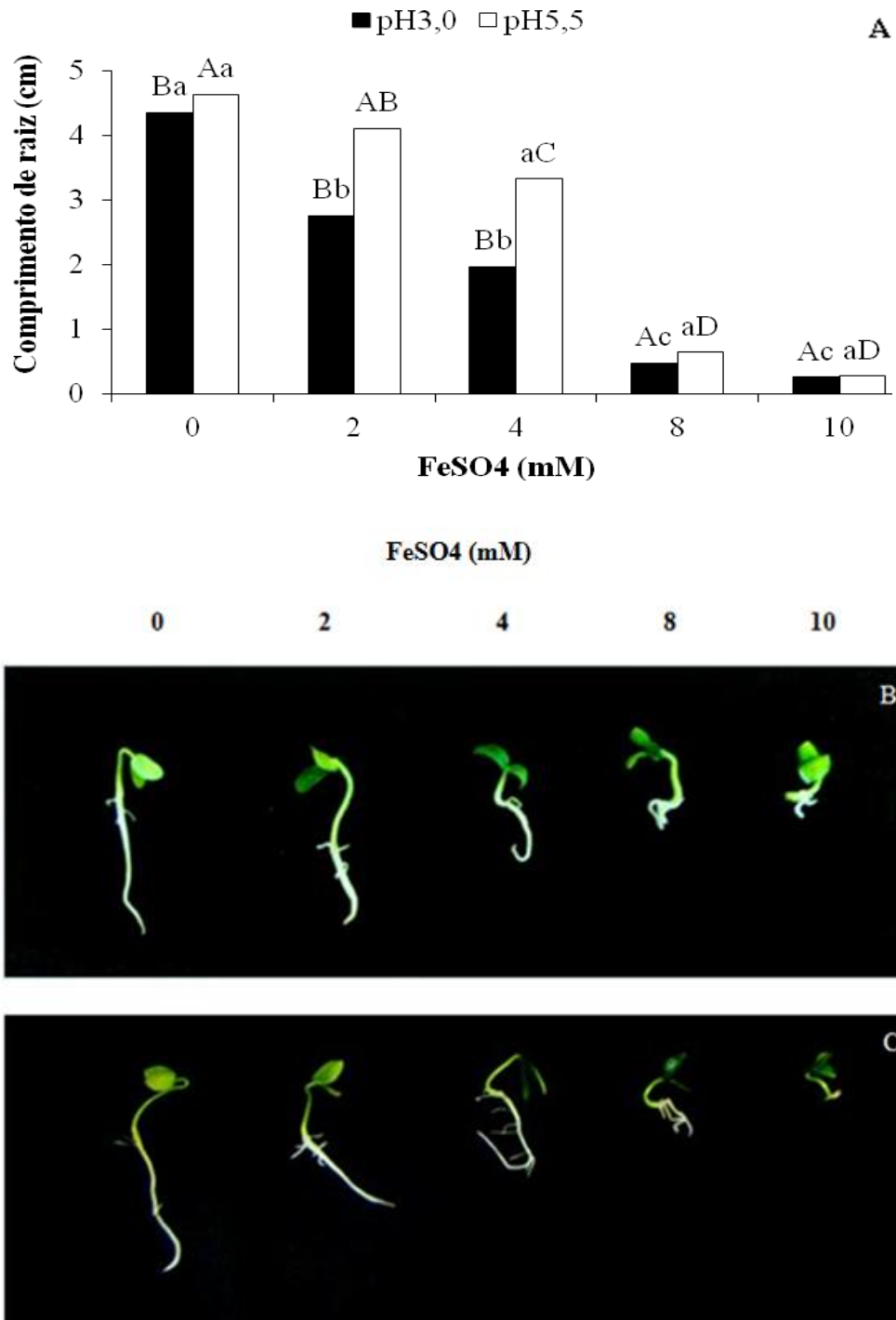


Figura 2. Comprimento (cm) da raiz (A) e aspectos morfológicos de plântulas de *Cedrela fissilis* aos 15 dias de incubação em diferentes concentrações de sulfato de ferro e pH 3,0 (B) e 5,5 (C). Letras maiúsculas diferentes denotam diferenças significativas entre as concentrações de sulfato de ferro em cada pH. Letras minúsculas diferentes denotam diferenças significativas entre os pHs testados para cada concentração de sulfato de ferro. Médias seguidas por letras diferentes são significativamente diferentes ($P < 0,05$) de acordo com o teste SNK. CV = coeficiente de variação. ($n = 4$; CV = 18,46%).

Adicionalmente, o aumento nas concentrações de sulfato de ferro afetou tanto a área como o volume das raízes das plântulas de *C. fissilis*, com redução maior observada em plântulas mantidas no pH 3,0 em relação ao pH 5,5 (Figura 3A e B). Em relação ao diâmetro da raiz, verificou-se diferença significativa para as plântulas incubadas no tratamento com 10 mM de sulfato de ferro em pH 3,0 comparativamente ao pH 5.5, com aumento no diâmetro (Figura 3C). Estes resultados mostram uma redução na área, volume radicular e aumento no diâmetro da raiz em plântulas de *C. fissilis*.

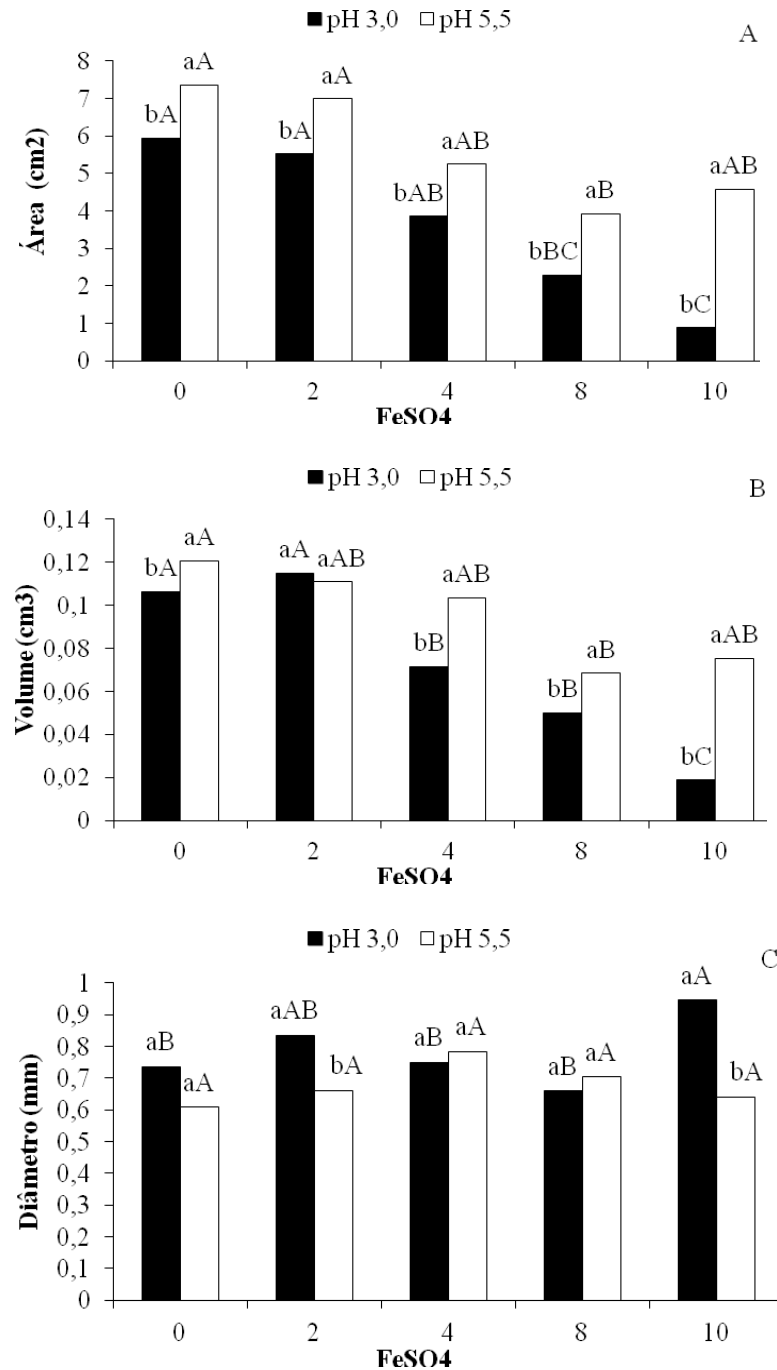


Figura 3. Valores referentes a área (A), volume (B) e diâmetro (C) radicular em plântulas de *Cedrela fissilis* aos 15 dias de incubação em diferentes concentrações de sulfato de ferro e em pH 3,0 e 5,5. Letras maiúsculas diferentes denotam diferenças significativas entre as concentrações de sulfato de ferro no mesmo pH. Letras minúsculas diferentes denotam diferenças entre os pH na mesma concentração de ferro. Médias seguidas por letras diferentes são significativamente diferentes ($P < 0,05$) de acordo com o teste SNK. CV = coeficiente de variação ($n = 4$; CV área = 28,22%; CV volume = 24,45%; CV diâmetro = 14,27%).

5.1.3. Determinação da MF e MS

As concentrações de sulfato de ferro e pH afetaram significativamente os valores de MF e MS em plântulas de *C. fissilis* (Figura 4). Para a parte aérea verificou-se acúmulo significativo de MF nas plântulas mantidas em pH 5,5 (Figura 4A), enquanto na parte radicular, verificou-se redução significativa da MF para os dois pHs (3,0 e 5,5) com o aumento das concentrações de sulfato de ferro testadas, sendo o acúmulo maior para o pH 5,5 (Figura 4B).

Quanto a MS, verificou-se que os pHs e as diferentes concentrações de sulfato de ferro utilizadas não afetaram significativamente este parâmetro na parte aérea das plântulas de *C. fissilis* (Figura 4C). Por outro lado, verificou-se uma redução significativa da MS da raiz em plântulas mantidas em pH 3,0 e 5,5 e com o aumento das concentrações de sulfato de ferro usadas, com maior redução em pH 3,0 comparativamente ao 5,5 (Figura 4D).

Estes resultados mostram a influência significativa das concentrações de sulfato de ferro e pH no acúmulo de biomassa, tanto MF quanto MS, para as raízes de plântulas de *C. fissilis* (Figura 4). Estes resultados estão de acordo com os observados por Nguyen et al. (2005). Estes autores analisaram o efeito dos elementos ferro e alumínio em *Eucalyptus camaldulensis*, e observaram uma redução na MS tanto da raiz quanto das folhas com o aumento das concentrações de sulfato de ferro (120 μM) em pH 4,2. Na planta, a raiz é o primeiro órgão a sofrer o estresse causado por fatores abióticos no solo, principalmente com a salinidade e contaminação por metais pesados (Jiang et al., 2007), e conseqüentemente, pode apresentar uma redução no crescimento.

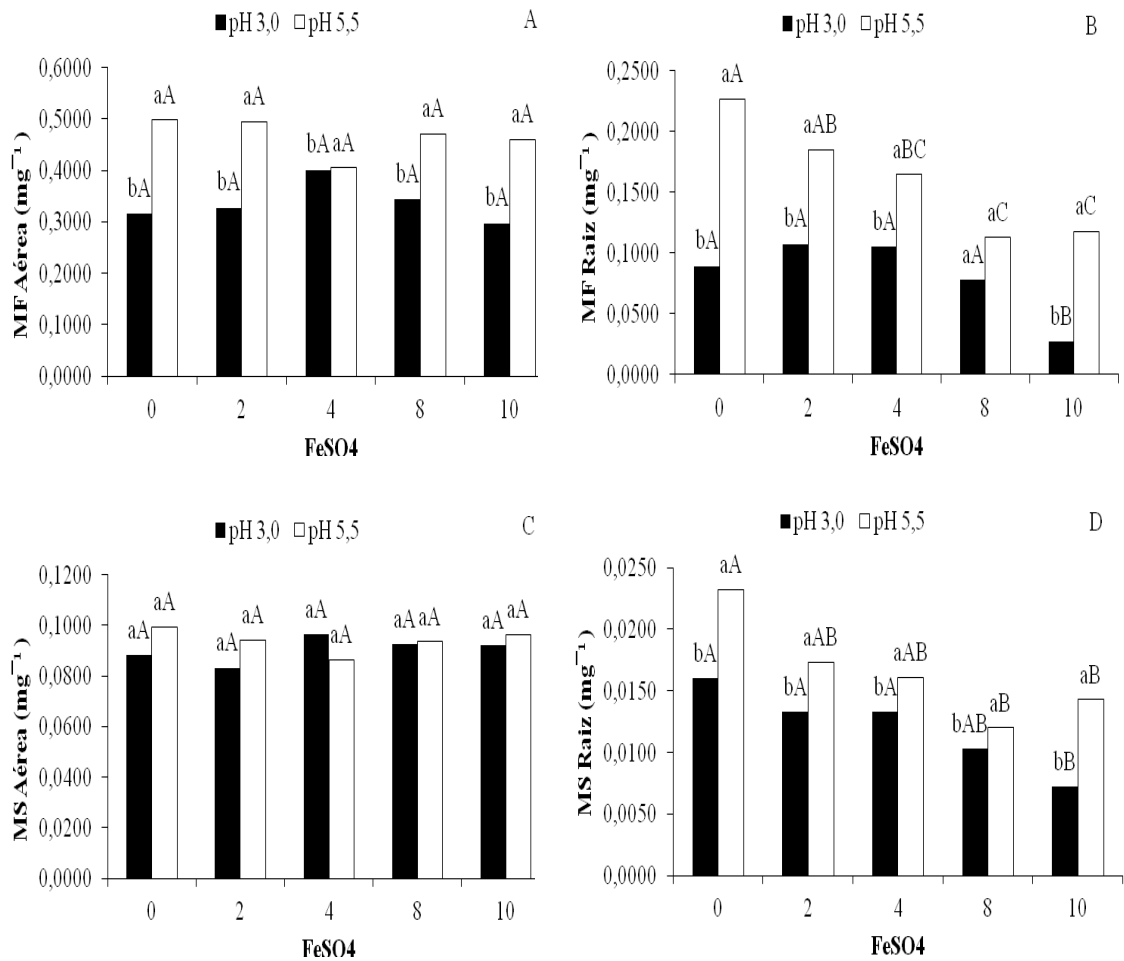


Figura 4. Matéria fresca (MF) da parte aérea (A) e da raiz (B) e matéria seca (MS) da parte aérea (C) e da raiz (D) de plântulas de *Cedrela fissilis* após 15 dias de incubação em diferentes concentrações de sulfato de ferro e pH 3,0 e 5,5. Letras maiúsculas diferentes denotam diferenças significativas entre as concentrações sulfato de ferro no mesmo pH. Letras minúsculas diferentes denotam diferenças significativas entre os pHs na mesma concentração de sulfato de ferro. Médias seguidas por letras diferentes são significativamente diferentes ($P < 0,05$) de acordo com o teste SNK. CV = coeficiente de variação ($n = 4$; CV MF da parte aérea = 17,24%; CV MF da raiz = 27,13%; CV MS da parte aérea = 10,10%; CV MS da raiz = 26,00%).

5.1.4. Determinação de PAs livres

Verificou-se efeito das diferentes concentrações de sulfato de ferro e do pH no conteúdo endógeno de PAs livres em plântulas de *C. fissilis* (Figura 5). Na parte aérea, verificou-se redução significativa do conteúdo de Put livre com o aumento nas concentrações de sulfato de ferro (Figura 5A). Contrariamente, na raiz verificou-se um aumento significativo desta PA com o aumento na concentração de sulfato de ferro utilizada (Figura 5A). Verificou-se maiores

concentrações de Put livre na parte aérea comparativamente com a raiz.

O conteúdo de Spd livre também foi afetado pela concentração de sulfato de ferro, verificando-se uma redução significativa na parte aérea e aumento significativo na raiz em plântulas incubadas no tratamento com 4mM de sulfato de ferro (Figura 5B). Similarmente ao observado para Put livre, o maior conteúdo de Spd foi observado na parte aérea comparativamente à raiz.

O conteúdo de Spm livre foi observado em menor concentração comparativamente à Put e Spd, sendo também afetado significativamente pela concentração de sulfato de ferro (Figura 5C). O conteúdo de Spm na parte aérea reduziu significativamente com o aumento na concentração de sulfato de ferro, enquanto na raiz não foi verificado efeito significativo da concentração de sulfato de ferro sobre o conteúdo desta PA. Adicionalmente, o acúmulo de Spm foi maior na parte aérea comparada à raiz, similar ao observado para Put e Spd (Figura 5C).

Os tratamentos afetaram significativamente o conteúdo de PAs livres totais, verificando-se redução significativa na parte aérea, e contrariamente, aumento significativo na raiz, com o aumento na concentração de sulfato de ferro utilizada (Figura 5D). O acúmulo de PAs livres totais foi maior na parte aérea comparado com a raiz (Figura 5D).

As PAs são compostos que atuam na redução dos efeitos do estresse induzidos pelos metais pesados (Luo et al., 2009; Aldesuquy et al., 2014). A atuação das PAs na redução do estresse nas plantas é dependente da espécie estudada, do tecido analisado e do tipo de estresse causado, atuando de acordo com a intensidade do estresse na tolerância à espécies reativas de oxigênio produzidas, assim como também na redução do excesso destas espécies reativas de oxigênio (Alcázar et al., 2006). Em *C. fissilis* verificou-se variações significativas no conteúdo das PAs Put e Spd de acordo com o tecido analisado, ocorrendo redução significativa na parte aérea e aumento significativo no tecido radicular com o aumento na concentração de sulfato de ferro (Figura 5). Segundo Groppa et al. (2008) o acúmulo de PAs induzidas por metais em excessos que induzem efeito tóxicos, podem atuar como marcadores de toxicidade quando não revertem a inibição do crescimento radicular. De acordo com Majerus et al. (2007) as PAs tem capacidade de estabilização de membrana através da interação destas com os lipídios de membrana, além de desempenhar um papel importante

na proteção celular.

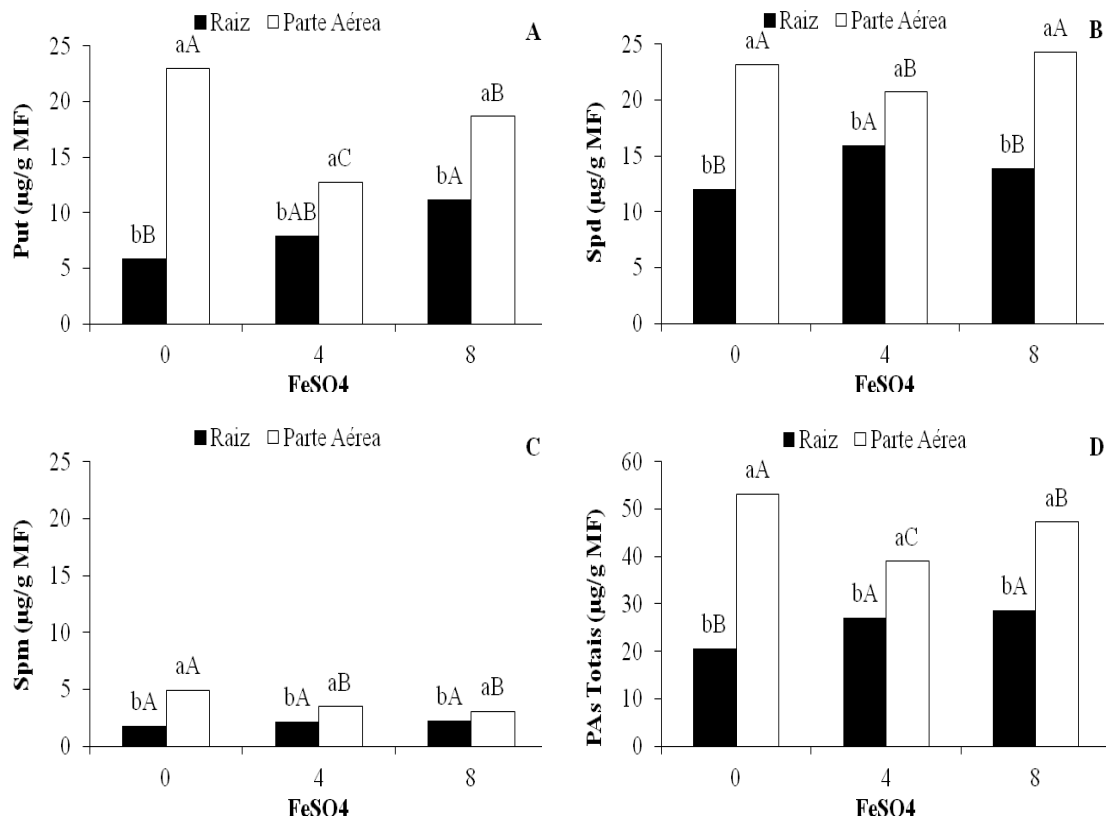


Figura 5. Conteúdo ($\mu\text{g g}^{-1}$ de MF) das PAs livres Put (A), Spd (B) e Spm (C), e PAs livres totais (D) em raízes e parte aérea de plântulas de *Cedrela fissilis* aos 15 dias de incubação em diferentes concentrações de sulfato de ferro em pH 3,0. Letras maiúsculas diferentes denotam diferenças significativas entre as concentrações de sulfato de ferro no mesmo pH. Letras minúsculas diferentes denotam diferenças significativas entre os tecidos (raiz e parte aérea) na mesma concentração de sulfato de ferro. Médias seguidas por letras diferentes são significativamente diferentes ($P < 0,05$) de acordo com o teste SNK. CV = coeficiente de variação. ($n = 3$; CV de Put = 18,19%; CV de Spd = 6,24%, CV de Spm = 14,12%; CV de PAs livres totais = 9,08%).

5.1.5. Determinação de nutrientes

A análise de nutrientes durante a germinação foi realizada em plântulas com 15 dias tratadas com as diferentes concentrações de sulfato de ferro em pH 3,0. Verificou-se que as concentrações de sulfato de ferro afetaram significativamente a concentração de alguns nutrientes, o qual variou quanto ao tipo de tecido (raiz e folha) analisado (Tabela 1).

Dentre os nutrientes avaliados, verificou-se nas folhas das plântulas um aumento significativo na concentração de S e redução significativa de Mg com o aumento nas concentrações de sulfato de ferro (Tabela 1). Por outro lado, na raiz das plântulas houve um aumento significativo de Fe, Mn, Zn, Ca, S e N e redução de Mo com o aumento da concentração de sulfato de ferro. O nutriente B foi observado em alta concentração em raiz das plântulas mantidas nos tratamentos controle e 8 mM de sulfato de ferro, comparativamente com 4 mM (Tabela 1).

Ademais, observou-se que a concentração do elemento Fe aumentou significativamente com o aumento na concentração de sulfato de ferro no tecido radicular, enquanto na parte aérea não foi verificada alteração significativa (Tabela 1). O nível crítico de ferro para a planta é espécie-dependente, e para *C. fissilis* ainda não há relato na literatura de estudos sobre este parâmetro. Siqueira-Silva et al. (2012) verificaram em folhas de *Ipomea pes-caprae* e *Canavalia rosea* um menor acúmulo de ferro comparativamente com as raízes, sugerindo uma possível limitação na translocação deste nutriente da raiz para a parte aérea. Adicionalmente, o aumento nas concentrações de Zn na raiz das plântulas incubadas em 8 mM sugere que pode ter ocorrido um distúrbio nutricional induzido pelo excesso de ferro em *C. fissilis*. (Siqueira-Silva et al., 2012) observaram que a adição de 126 mg. L⁻¹ de sulfato de ferro na solução nutritiva promoveu um aumento da assimilação de Zn pelas raízes em *C. rosea* e redução de N nas folhas, sugerindo que o ferro em excesso causa distúrbio nutricional devido a formação das placas de ferro. Neste sentido, plântulas de *C. fissilis* tratadas com 8 mM de sulfato de ferro apresentaram redução na concentração de Mo e P (Tabela 1), os quais podem estar possivelmente, acumulado nas placas de ferro na superfície do tecido radicular, tornando-se menos disponível para a absorção pelas raízes das plântulas em condições de excesso de ferro.

Adicionalmente, o Mg é um dos principais componentes da molécula de clorofila nas folhas, tornando-se essencial para o processo da fotossíntese (Streit et al., 2005). Em *C. fissilis* verificou-se uma redução significativa na concentração de Mg em folhas das plântulas tratadas com 4 e 8 mM de sulfato de ferro, sugerindo que possa ter ocorrido um possível dano oxidativo nas moléculas

clorofilas, uma vez que foi observado alteração na morfologia da plântula (Figura 2B–C) nas maiores concentrações de sulfato de ferro utilizada.

Tabela 1 – Concentração de nutrientes em raízes e folhas de plântulas de *Cedrela fissilis* após 15 dias de incubação em diferentes concentrações de sulfato de ferro (0, 4 e 8 mM) em pH 3,0.

Nutrientes**	Raiz			Folha			CV (%)
	FeSO ₄ (mM)			FeSO ₄ (mM)			
	0,0019	4	8	0,0019	4	8	
B	153,37aA*	96,02aB	137,16aA	57,05bA	63,61bA	65,64bA	14,26
Cu	82,22aA	87,76aA	89,56aA	58,18bA	54,36bA	55,60bA	6,59
Fe	127,1aC	1034,7aB	2933,0aA	31,90aA	72,16bA	168,30bA	22,74
Mn	9,25bC	16,27bB	30,62bA	31,44aA	35,14aA	37,12aA	11,91
Mo	0,418aA	0,122bB	0,148bB	0,409aA	0,295aA	0,282aA	33,75
Zn	44,72bB	50,63bB	70,92bA	113,7aA	117,04aA	115,28aA	8,02
Ca	0,307bB	0,457bB	1,65bA	2,71aA	3,23aA	2,76aA	28,56
K	43,46aA	41,53aA	42,02aA	19,16bA	20,26bA	20,21bA	4,79
Mg	1,22bB	1,22bB	1,71bAB	6,17aA	5,65aB	5,45aB	7,10
P	9,01bAB	8,25bB	8,38bB	13,14aA	12,72aA	12,06aA	6,23
S	5,79bC	7,14bB	8,84aA	8,04aB	7,93aB	8,68aA	3,11
N	53,59bB	55,21bAB	57,63bA	81,55aA	82,54aA	81,37aA	2,84

* Médias seguidas por letras diferentes são significativamente diferentes ($P < 0,05$) de acordo com o teste SNK. Letras maiúsculas diferentes denotam diferenças significativas entre as concentrações de sulfato de ferro no mesmo tecido (parte aérea ou radicular). Letras minúsculas diferentes denotam diferenças significativas entre os tecidos (parte aérea e radicular) na mesma concentração de sulfato de ferro. CV = coeficiente de variação. (n= 3).

** Concentração dos nutrientes Ca, K, Mg, P, S e N em g kg⁻¹ de MS. Concentração dos nutrientes B, Cu, Fe, Mn, Mo e Zn em mg kg⁻¹ de MS.

5.2. Efeito do ferro e pH no crescimento das mudas micropropagadas

5.2.1. Determinação da altura e diâmetro

As concentrações de sulfato de ferro e os dois pHs utilizados não afetaram significativamente o crescimento das mudas micropropagadas, não sendo observado diferenças significativas para os parâmetros diâmetro (Figura 6A) e altura (Figura 6B) da parte aérea. Contrariamente, Pereira et al. (2009)

observaram um efeito negativo em plantas de *Clusia hilariana* submetidas a aplicação de material sólido particulado de Fe (MSPFe) na folhas, ocorrendo redução significativa de vários parâmetros biométricos analisados, como altura e número de folhas. Por outro lado, quando o MSPFe foi aplicado no solo, não houve diferenças significativas sobre os parâmetros biométricos em *C. hilariana* (Pereira et al., 2009).

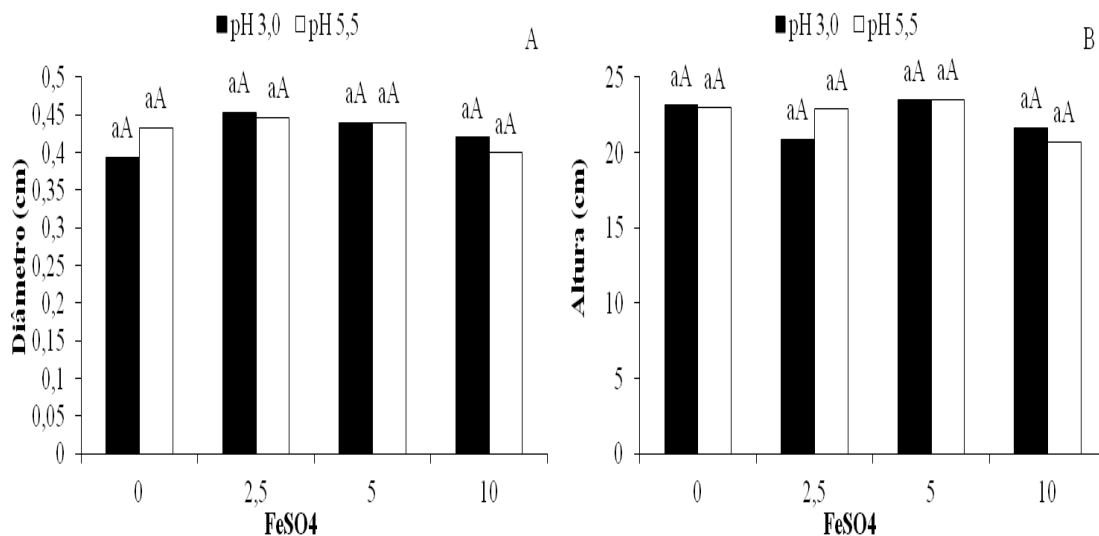


Figura 6. Diâmetro (A) e altura (B) da parte aérea das mudas micropropagadas de *Cedrela fissilis* após 60 dias de crescimento em diferentes concentrações de sulfato de ferro (0; 2,5; 5 e 10 mM) e pHs (3,0 e 5,5). Letras maiúsculas diferentes denotam diferenças significativas entre as concentrações de sulfato de ferro em cada pH. Letras minúsculas diferentes denotam diferenças significativas entre os pHs em cada concentração de sulfato de ferro. Médias seguidas por letras diferentes são significativamente diferentes ($P < 0,05$) de acordo com o teste SNK. CV = coeficiente de variação. ($n = 15$; CV do diâmetro= 22,85%; CV da altura = 18,65%).

5.2.2. Determinação da fluorescência da clorofila a

A relação Fv/Fm não diferiu significativamente entre as concentrações de sulfato de ferro e pH testadas. Adicionalmente, observou-se valores acima de 0,75 para a relação Fv/Fm, indicando que não houve danos foto-inibitórios no aparato fotossintético (Figura 7A). De acordo com Boardman (1977) valores da razão Fv/Fm entre 0,75 e 0,85 são característicos de plantas em ótimas condições desenvolvimento. Adicionalmente, o rendimento quântico máximo do fotossistema II (Figura 7A) não apresentou danos fotoinibitórios no aparato

fotossintético, com valores de Fv/Fm acima de 0,75. Pereira et al. (2013) trabalhando com excesso de ferro em arroz (*Oryza sativa*), sendo 4 mM em variedade sensível e 7mM para a tolerante, verificaram que a relação Fv/Fm reduziu significativamente, apresentando suscetibilidade a fotoinibição e comprometendo assim, o transporte de elétrons na cadeia transportadora.

Em pH 3,0, observou-se um aumento significativo no teor relativo de clorofila nas mudas micropropagadas de *C. fissilis* na presença de sulfato de ferro comparado com o tratamento controle, havendo diferenças significativas entre as concentrações de sulfato de ferro (Figura 7B). Em pH 5,5, as concentrações de sulfato de ferro não afetaram significativamente o teor de clorofila (Figura 7B). Contrariamente, Li et al. (2012) observaram um aumento significativo no teor de clorofila total, incluindo clorofila a e b, em mudas de trigo expostas ao aumento das concentrações de cloreto férrico (300 e 500 μ M). Oliveira et al. (2008) não observaram diferenças significativas quando avaliaram o efeito do MSPFe no teor de pigmentos de *Schinus terebinthifolius* em período seco e chuvoso. Por outro lado, Fan & Wang (2000), trabalhando com cinco espécies arbóreas (*Cinnamomum camphora*, *Ligustrum lucidum*, *Castanopsis fissa*, *Melia azedarach* e *Koelreuteria bipinnata*), observaram uma redução no teor de clorofila das mudas quando submetidas à chuva ácida simulada com pH entre 2 e 3,5.

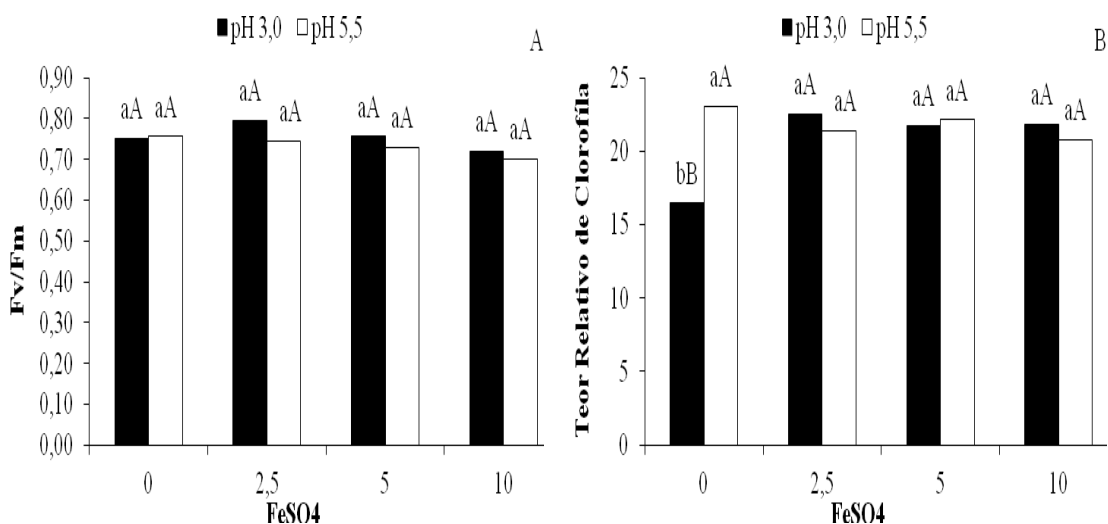


Figura 7. Rendimento quântico máximo do fotossistema II (A) e teor relativo de clorofila (B) em mudas micropropagadas de *Cedrela fissilis* aos 60 dias em diferentes concentrações de sulfato de ferro (0; 2,5; 5 e 10 mM) e pHs (3,0 e 5,5). Letras maiúsculas diferentes denotam diferenças significativas entre as concentrações de sulfato de ferro em cada pH. Letras minúsculas diferentes denotam diferenças significativas entre os pHs

em cada concentração de sulfato de ferro. Médias seguidas por letras diferentes são significativamente diferentes ($P < 0,05$) de acordo com o teste SNK. CV = coeficiente de variação. ($n = 4$; CV de $F_v/F_m = 8,67\%$; CV do teor relativo de clorofila = $12,24\%$).

5.2.3. Determinação das trocas gasosas

Os parâmetros fotossintéticos referentes a taxa de assimilação líquida de carbono (Figura 8A), condutância estomática (Figura 8B) e taxa transpiratória (Figura 8C) em mudas micropropagadas de *C. fissilis* não foram afetadas pelas diferentes concentrações de sulfato de ferro (0 a 10 mM) e pHs (3,0 e 5,5) após 60 dias de tratamento. A taxa fotossintética está diretamente relacionada com o teor de clorofilas, afetando processos de crescimento da planta (An et al., 2009). De acordo com Adamski et al. (2011) plantas de *Ipomoea batatas* cultivadas em condições com excesso de Fe-EDTA (9 mM) apresentaram um aumento no teor de clorofila porém, ocorreu uma redução da taxa fotossintética, assim como uma redução na produção de NADPH e ATP nas plantas (Casierra-Posada et al., 2017). As mudas micropropagadas de *C. fissilis* submetidas aos diferentes tratamentos de ferro podem, possivelmente, ter adquirido uma tolerância ao crescimento com alta concentração de ferro, evitando assim a indução de danos nas folhas. Foi mostrado que, o manitol e a glutatona reduzida, inibem a toxicidade causada pelo sulfato de ferro (ao usar 10 mM) em folhas de arroz, atuando na redução de radicais livres (Fang et al., 2001).

Adicionalmente, Pereira et al. (2013) sugerem que, com a redução da condutância estomática diminui também o transporte de ferro para as folhas, visto que o ferro é transportado pelo fluxo de transpiração pelo xilema, sendo um mecanismo de evitação de absorção excessiva de ferro. Entretanto, no presente estudo, as mudas micropropagadas de *C. fissilis* não apresentaram diferenças significativas para condutância estomática quando submetidas às diferentes concentrações de sulfato de ferro e pH testados.

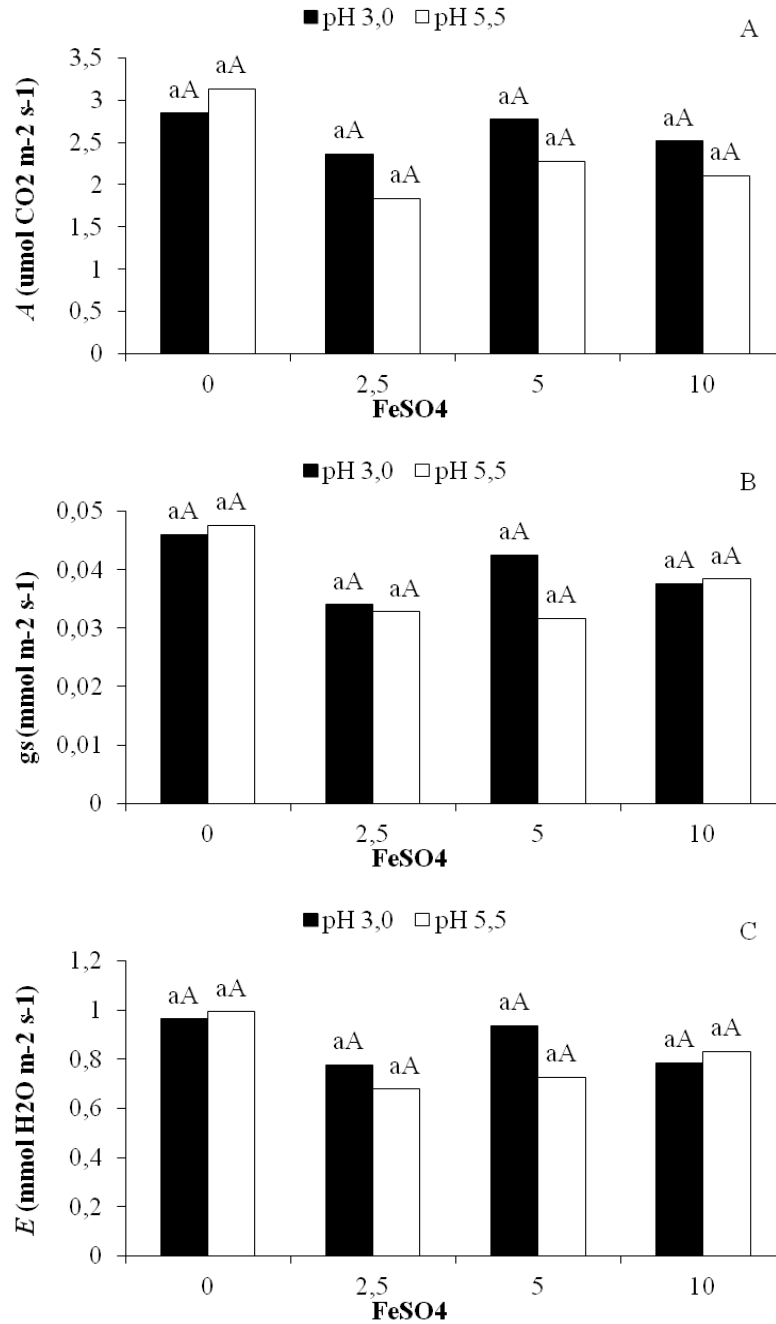


Figura 8. Taxa de assimilação líquida de carbono (A), condutância estomática (B) e taxa transpiratória (C) em mudas micropropagadas de *Cedrela fissilis* aos 60 dias de tratamento com diferentes concentrações de sulfato de ferro (0; 2,5; 5 e 10 mM) e pH (3,0 e 5,5). Letras maiúsculas diferentes denotam diferenças entre as concentrações de sulfato de ferro em cada pH. Letras minúsculas diferentes denotam diferenças significativas entre os dois pH em cada concentração de sulfato de ferro. Médias seguidas por letras diferentes são significativamente diferentes ($P < 0,05$) de acordo com o teste SNK. CV = coeficiente de variação. ($n = 4$; CV da taxa de assimilação líquida de carbono = 25,22%; CV da condutância estomática = 24,29%; CV da taxa transpiratória = 22,94%).

5.2.4. Análises biométricas

No presente estudo, os parâmetros biométricos referentes ao comprimento (Figura 9A), diâmetro (Figura 9B), área superficial (Figura 9C) e volume radicular (Figura 9D) não foram afetados significativamente em mudas micropropagadas de *C. fissilis* após 60 dias de incubação em diferentes concentrações de sulfato de ferro e em pH 3,0 e 5,5 (Figura 9). Entretanto, uma redução no crescimento e nas ramificações laterais da raiz foi observado em mudas de *I. pes-caprae* e *C. roseal* submetidas à 126 mg.L⁻¹ de íon ferroso em pH 5,5 (Siqueira-Silva et al., 2012). Estes resultados sugerem que a resposta ao efeito do ferro pode ser dependente da espécie em estudo.

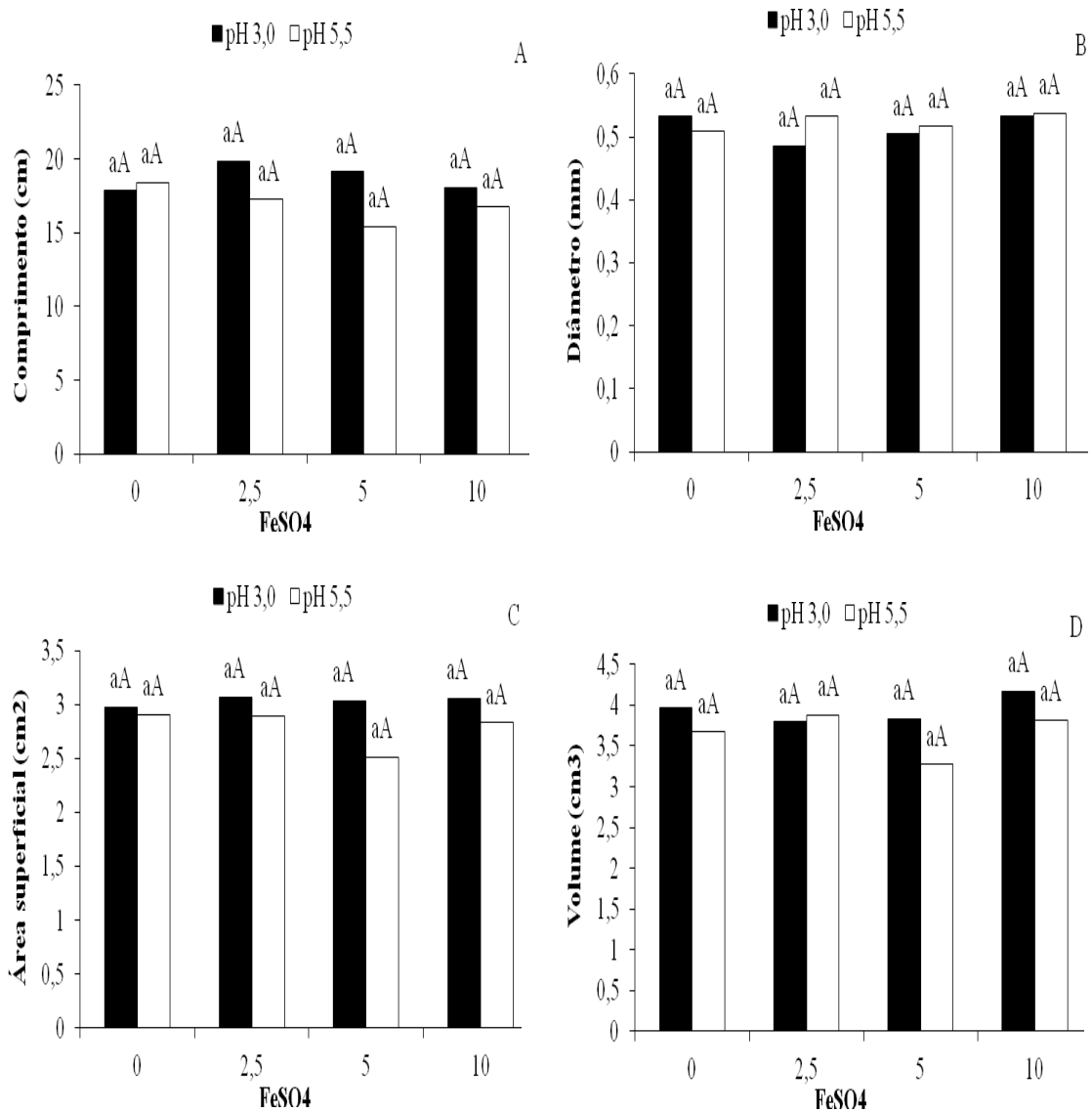


Figura 9. Comprimento (A), diâmetro (B), área superficial (C) e volume (D) radicular em mudas micropropagadas de *Cedrela fissilis* aos 60 dias de tratamento em diferentes concentrações de sulfato de ferro (0; 2,5; 5 e 10 mM) e em pH 3,0 e 5,5. Letras maiúsculas diferentes denotam diferenças significativas entre as concentrações de sulfato de ferro em cada pH. Letras minúsculas diferentes denotam diferenças significativas entre os pHs em cada concentração de sulfato de ferro. Médias seguidas por letras diferentes são significativamente diferentes ($P < 0,05$) de acordo com o teste SNK. CV = coeficiente de variação. ($n = 4$; CV do comprimento = 20,25%; CV do diâmetro = 7,95%; CV da área superficial = 23,56%; CV do volume = 29,01%).

5.2.5. Determinação da área foliar e do caule

Os parâmetros área foliar (Figura 10A) e área do caule (Figura 10B) não foram afetados significativamente com as concentrações de sulfato de ferro e pH testados em mudas micropropagadas de *C. fissilis*.

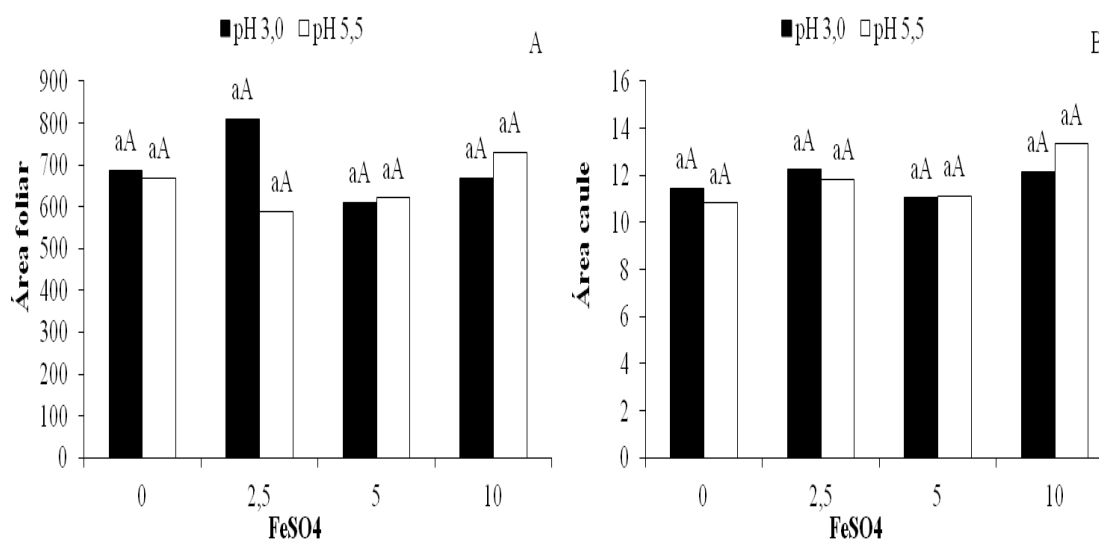


Figura 10. Área foliar (A) e do caule (B) em mudas micropropagadas de *Cedrela fissilis* aos 60 dias de tratamento em diferentes concentrações de sulfato de ferro e pH 3,0 e 5,5. Letras maiúsculas diferentes denotam diferenças significativas entre as concentrações de sulfato de ferro em cada pH. Letras minúsculas diferentes denotam diferenças significativas entre os pHs em cada concentração de sulfato de ferro. Médias seguidas por letras diferentes são significativamente diferentes ($P < 0,05$) de acordo com o teste SNK. CV = coeficiente de variação. ($n = 4$; CV da área foliar = 26,87%; CV da área do caule = 16,48%).

5.2.6. Determinação da matéria fresca (MF) e matéria seca (MS)

Os parâmetros MF e MS tanto da raiz quanto da parte aérea não foram significativamente afetados pelas diferentes concentrações de sulfato de ferro e pH testados em mudas micropropagadas de *C. fissilis* (Figura 11), apesar de alterações na concentração de alguns nutrientes e do alto teor de Fe na raiz e caule (Tabela 2). Avaliando a tolerância a altas concentrações de Fe em plantas de *Setaria parviflora* e *Paspalum urvillei* foi verificado efeitos negativos da toxicidade do Fe, apresentando altas taxas de crescimento e produção de biomassa (Araújo et al., 2014). Porém, estes resultados são variáveis depende da espécie estudada. Plantas de *Eugenia uniflora* aos 45 dias de exposição ao tratamento com 2 mM de Fe apresentaram reduções na produção de massa seca de folhas, caule e raízes quando comparadas ao tratamento controle (Jucoski et al., 2016). Em *C. fissilis*, como não houve efeito do excesso de ferro nos parâmetros fotossintéticos (Figura 8) a produção de fotoassimilados não foi afetada, não sendo afetado assim a biomassa das mudas micropropagadas.

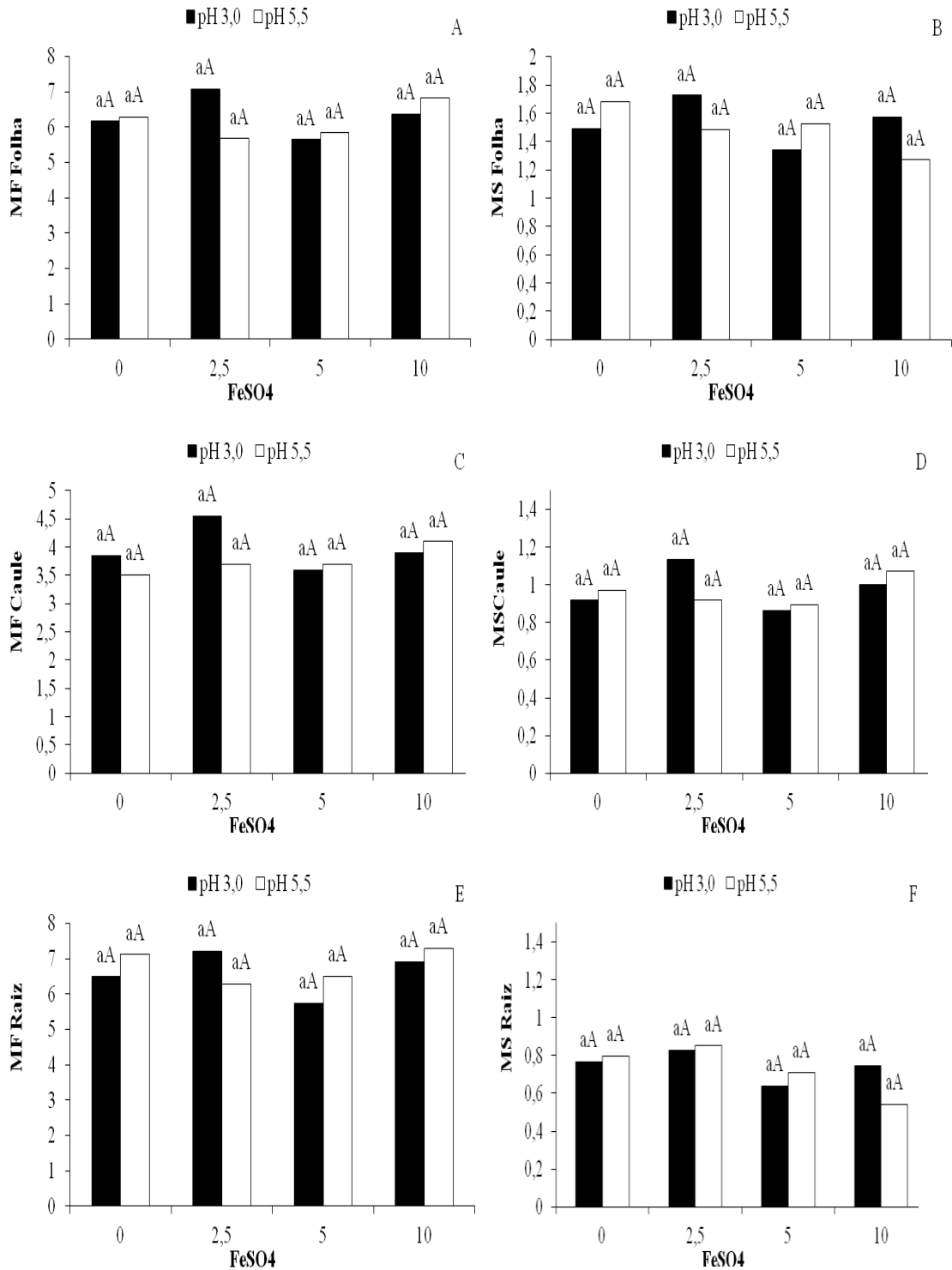


Figura 11. Matéria fresca (MF) da folha (A), caule (C) e da raiz (E) e matéria seca (MS) da folha (B), caule (D) e da raiz (F) de mudas micropropagadas de *Cedrela fissilis* aos 60 dias de tratamento em diferentes concentrações de sulfato de ferro e pH 3,0 e 5,5. Letras maiúsculas diferentes denotam diferenças significativas entre as concentrações de sulfato de ferro em cada pH. Letras minúsculas diferentes denotam diferenças significativas entre os pHs em cada concentração de sulfato de ferro. Médias seguidas por letras diferentes são significativamente diferentes ($P < 0,05$) de acordo com o teste SNK. CV = coeficiente de variação. ($n = 4$; CV MF folha = 27,58%; CV MF caule = 23,56%; CV MF raiz = 27,42%; CV MS folha = 25,46%; CV MS caule = 28,51%; CV MS raiz = 27,50%).

5.2.7. Determinação de poliaminas (PAs) livres

Verificou-se alterações significativas no conteúdo endógeno das PAs Put, Spd e Spm de acordo com o tecido (raiz e parte aérea) e as concentrações de sulfato de ferro e pH utilizados (Figura 12).

Analisando o conteúdo de Put livre em raiz, verificou-se que o pH afetou significativamente o conteúdo desta PA, ocorrendo maior conteúdo de Put em raízes de mudas micropropagadas mantidas em pH 5,5, enquanto as concentrações de sulfato de ferro não apresentaram efeito significativo para esta PA (Figura 12A). Na parte aérea, verificou-se o efeito das concentrações de sulfato de ferro em pH 3,0, reduzindo significativamente o conteúdo de Put nas concentrações de 2,5 e 5 mM, aumentando significativamente na maior concentração de sulfato de ferro (10 mM), sem diferir estatisticamente do tratamento controle. Por outro lado, nas mudas mantidas em pH 5,5 houve um aumento significativo do conteúdo de Put livre na maior concentração de sulfato de ferro testado (Figura 12B). Comparando-se os pHs 3,0 e 5,5, verificou-se maior conteúdo de Put em mudas micropropagadas mantidas em pH 3,0 sem a adição de sulfato de ferro (tratamento controle).

O conteúdo de Spd tanto em raiz (Figura 12C) quanto em folhas (Figura 12D) de mudas micropropagadas não foi afetado significativamente pelas concentrações de sulfato de ferro, mas sim pelo pH, ocorrendo conteúdos significativamente maiores em raízes e folhas mantidas em pH 5,5. Comparando-se os dois tecidos analisados, verificou-se maior conteúdo desta PA em folhas comparativamente às raízes.

Na raiz, o conteúdo de Spm livre foi significativamente maior em 10 mM de sulfato de ferro no pH 3,0, enquanto no pH 5,5, não verificou-se efeito das concentrações de sulfato de ferro testadas (Figura 12E). Comparando-se os dois pHs, um conteúdo significativamente maior de Spm foi observado em pH 3,0 no controle e com 2,5 mM de sulfato de ferro. Por outro lado, nas folhas, o conteúdo de Spm livre não foi afetado pelas concentrações de sulfato de ferro em pH 3,0, enquanto no pH 5,5 houve redução significativa desta PA na maior concentração de sulfato de ferro testada (10 mM) (Figura 12F).

As PAs exercem ação protetora como antioxidantes. Estudos em *Nicotiana tabaccum* mostram a ação do excesso de ferro em folhas, verificando-se maior acúmulo de PAs nas folhas novas comparado com as folhas velhas (Løvaas & Olsen, 1998). As PAs tem a capacidade de se ligar a compostos que contenham fósforo e ácidos nucleicos (Tadolini, 1988) diminuindo a ação de radicais de oxigênio. Raízes das mudas micropropagadas não apresentaram acúmulo das PAs Put e Spd com o excesso de ferro, no entanto, para a Spm houve diferença significativa, com aumento em 10 mM de sulfato de ferro (Figura 12). Nas folhas houve aumento de Put quando as mudas foram incubadas em 10mM e redução de Spm em mudas mantidas em 10mM no pH 5,5, no entanto, para a Spd não houve diferenças significativas. As folhas acumularam mais Spd e Spm livres que as raízes. Roupael et al. (2016) avaliando alterações metabólicas em alface (*Lactuca sativa* L.) sob diferentes concentrações de NaCl isosmolar e ZnSO₄ identificaram o acúmulo de PAs livres em condição de estresse de ZnSO₄ (100 mM), sugerindo que o estresse osmótico e o desequilíbrio redox é importante para determinar resposta do metabolismo em raiz do alface.

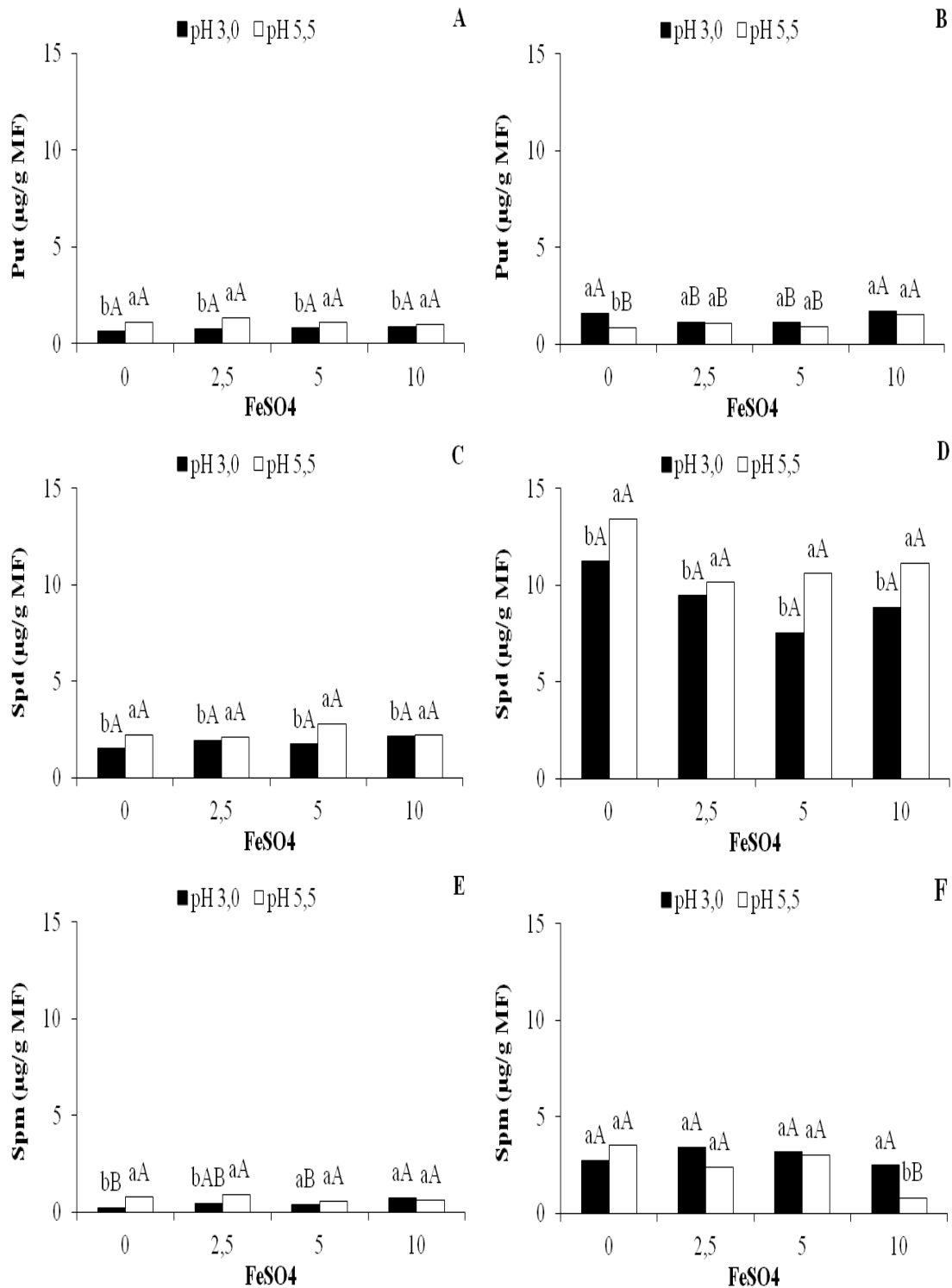


Figura 12. Conteúdo ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de MF) de PAs livres Put (A), Spd (C) e Spm (E) na raiz e Put (B), Spd (D) e Spm (F) nas folhas de mudas micropropagadas de *Cedrela fissilis* aos 60 dias de tratamento com diferentes concentrações de sulfato de ferro e pH 3,0 e 5,5. Letras maiúsculas diferentes denotam diferenças significativas entre as concentrações de sulfato de ferro em cada pH. Letras minúsculas diferentes denotam diferenças significativas entre os pHs em cada concentração de sulfato de ferro. Médias seguidas por letras diferentes são significativamente diferentes ($P < 0,05$) de acordo com o teste SNK. CV = coeficiente de variação. ($n = 3$; CV Put raiz = 21,97%; CV Spd raiz = 24,12%, CV Spm raiz = 27,23%; CV Put folha = 17,38%; CV Spd folha = 22,78%, CV Spm folha = 22,86%).

Em relação ao conteúdo de PAs livres totais, não verificou-se efeito significativo das concentrações de sulfato de ferro em ambos, raiz (Figura 13A) e folhas (Figura 13B). Por outro lado, o pH afetou significativamente o conteúdo de PAs livres totais em raízes comparativamente com as folhas (Figura 13A). Entretanto, um maior conteúdo de PAs livres totais foi observado em folhas comparativamente às raízes (Figura 13B).

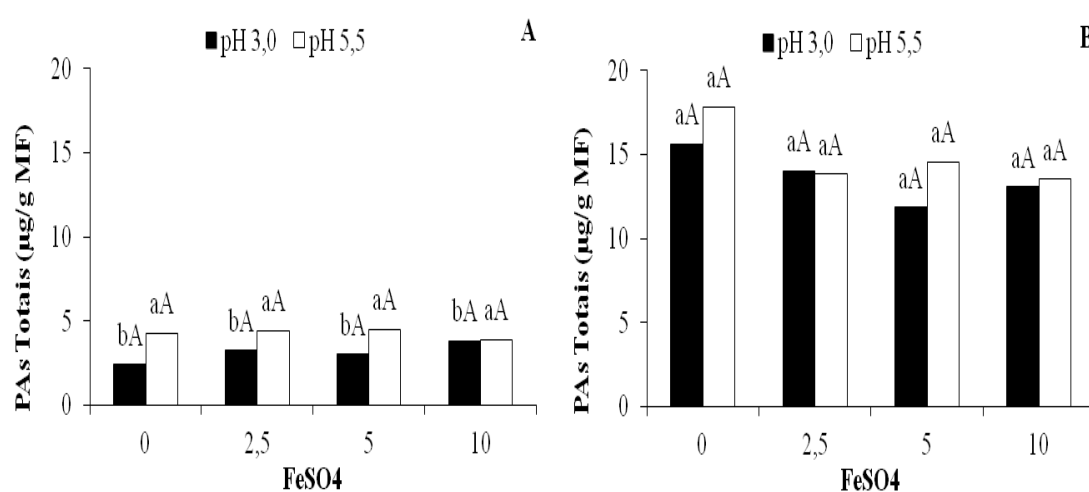


Figura 13. Conteúdo ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de MF) de PAs livres totais em raiz (A) e folhas (B) de mudas micropropagadas plântulas de *Cedrela fissilis* aos 60 dias de tratamento com diferentes concentrações de sulfato de ferro em pH 3,0 e 5,5. Letras maiúsculas diferentes denotam diferenças significativas entre as concentrações de sulfato de ferro em cada pH. Letras minúsculas diferentes denotam diferenças significativas entre os pH em cada concentração de sulfato de ferro. Médias seguidas por letras diferentes são significativamente diferentes ($P < 0,05$) de acordo com o teste SNK. CV = coeficiente de variação. ($n = 3$; CV PAs livres totais raiz = 19.95%; CV PAs livres totais folha = 18.40%).

5.2.8. Determinação de nutrientes em mudas micropropagadas

Verificou-se que a concentração de alguns nutrientes foi afetado significativamente pelo pH e pelas concentrações de sulfato de ferro em raízes e parte aérea das mudas micropropagadas de *C. fissilis* (Tabela 2). Em raízes mantidas em pH 3,0 foi verificado um aumento significativo na concentração de cobre na maior concentração de sulfato de ferro (10 mM), assim como um aumento significativo de Mn nas maiores concentrações (5 e 10 mM) de sulfato de ferro (Tabela 2). Por outro lado, uma redução na concentração de B, N e Fe foi

observado nas raízes mantidas nas concentrações de sulfato de ferro comparativamente ao controle.

Em pH 3,0, a concentração de K também reduziu significativamente em raízes de mudas micropropagadas mantidas em 2,5 mM de sulfato de ferro comparativamente ao controle, porém não diferiu significativamente do conteúdo nas maiores concentrações de sulfato de ferro. Por outro lado, a concentração de K reduziu significativa em raízes mantidas na maior concentração (10 mM) de sulfato de ferro em pH 5,5 (Tabela 2).

Em pH 5,5 verificou-se um aumento significativo de Zn em raízes tratadas com 2,5 e 5 mM de sulfato de ferro, com menores valores observados no controle e em 10 mM. Comparando-se os dois pHs, verificou-se menor acúmulo de Cu em raízes no pH 3,0 mantidas no controle e nas menores concentrações (2,5 e 5 mM) de sulfato de ferro (Tabela 2).

As concentrações de Ca e Mg foram menores nas concentrações de sulfato de ferro testadas, em pH 3,0 e 5,5, respectivamente. O elemento Fe foi observado em maior concentração nas raízes tratadas com 5 mM de sulfato de ferro nos dois pHs (3,0 e 5,5) (Tabela 2).

Mesmo com a redução na concentração dos elementos K, N, Fe e B em pH 3,0 na raiz (Tabela 2), não houve diferença significativa quanto aos parâmetros de crescimento, diâmetro, volume e área superficial da raiz (Figura 9). Trolldenier (1973) relataram que quanto menor a concentração de K na raiz, maior é a absorção de ferro, aumentando a intensificação da toxicidade deste elemento, pois reduz a capacidade da raiz de oxidar Fe^{2+} em Fe^{3+} . Porém esses dados podem ser variáveis dependendo da espécie. No presente estudo, mudas de *C. fissilis* mantidas em pH 3,0 apresentaram redução significativa na concentração de Fe acumulado no tecido da raiz, indicando que a capacidade de oxidar a rizosfera continuava ativa. De acordo com Pi et al. (2010) para a formação das placas de ferro nas raízes é importante que haja o processo de oxidação da rizosfera, sendo as placas de ferro constituídas por vários nutrientes (J. Liu et al. (2011). De acordo com Dobermann & Fairhurst (2000) concentrações de ferro acima de 500 mg.Kg⁻¹ do peso seco são consideradas tóxicas. Em *Setaria parviflora* e *Paspalum urvillei* foram observados altos níveis na raiz e parte aérea em 7 mM de Fe-EDTA, atingindo acúmulo de 6.090 e 960.25 mg.Kg⁻¹ respectivamente, de ferro no tecido da planta (Araújo et al., 2014).

Neste estudo, mudas mantidas em excesso de ferro (a partir de 2,5mM) verificou-se um aumento na absorção de Cu e Mn em pH 3,0, e de Zn nos tratamentos com 2,5 e 5 mM de sulfato de ferro em pH 5,5. Sugere-se que esses nutrientes não fizeram parte da composição química das placas de ferro estando assim, disponível para absorção pelas raízes de *C. fissilis* mesmo em ambiente com excesso de ferro. Zhang et al. (1999) mostraram um aumento na concentração de P nas placas de ferro em raízes de *O. sativa*. Estudos com excesso de ferro em espécies de restinga sugerem um aumento na assimilação dos elementos Cu, Mn, Mg, P e Ca pelas raízes, devido a ausência desses elementos nas placas de ferro, sugerindo que a espécie em estudo possivelmente desenvolveu mecanismo de adaptação ao efeito tóxico do ferro, evitando um estresse maior (Siqueira-Silva et al., 2012).

Tabela 2 - Composição mineral em raízes de mudas micropropagadas de *cedrela fissilis* aos 60 dias de tratamento em diferentes concentrações de sulfato de ferro em pH 3,0 e 5,5.

		FeSO ₄ (mM)								
		Micronutrientes (mg Kg ⁻¹)				Macronutrientes (g Kg ⁻¹)				
pH		0,0019	2,5	5,0	10	0,0019	2,5	5,0	10	
		Raízes				Raízes				
B	3,0	24,19aA	16,28aB	21,86aB	17,42aB	Ca 3,0	3,39aA	1,85bA	2,41bA	2,18bA
	5,5	22,92aA	30,37aA	32,59aA	24,72aA	5,5	2,87aA	2,62aA	3,30aA	2,34aA
	CV (%)	24,33				CV (%)	22,56			
Cu	3,0	22,90bB	19,34bB	23,8bB	29,46aA	K 3,0	27,63aA	20,74bB	24,2bAB	24,9aAB
	5,5	46,84aA	34,6aAB	37,1aAB	27,96aB	5,5	30,4aAB	29,85aA	32,33aA	24,86aB
	CV (%)	16,56				CV (%)	11,27			
Fe	3,0	297,4bA	274,8bB	555,1aB	363,8bB	Mg 3,0	2,85aA	2,40aA	2,65aA	2,51aA
	5,5	347,9cA	478,1bcA	896,3aA	631,0bA	5,5	3,15aA	2,35bA	2,63abA	2,42bA
	CV (%)	22,60				CV (%)	12,09			
Mn	3,0	123,0aB	120,0aB	160,9aA	167,9aA	P 3,0	2,59aA	1,72aA	2,29aA	2,09aA
	5,5	227,9aA	226,9aA	231,7aA	175,1aA	5,5	2,08aA	2,23aA	2,38aA	1,73aA
	CV (%)	25,53				CV (%)	22,93			
Mo	3,0	0,247aA	0,247aA	0,213aA	0,180aA	S 3,0	4,04aA	2,88aA	3,53aA	3,25aA
	5,5	0,220aA	0,167aA	0,217aA	0,203aA	5,5	3,74aA	3,39aA	4,56aA	3,83aA
	CV (%)	17,74				CV (%)	21,87			
Zn	3,0	67,46aA	51,24bA	75,55bA	76,55aA	N 3,0	12,10aA	8,63aB	11,45aB	10,81aB
	5,5	74,91aB	122,6aA	143,6aA	85,93aB	5,5	12,51aA	13,63aA	15,05aA	13,40aA
	CV (%)	24,02				CV (%)	17,39			

* Médias seguidas por letras diferentes são significativamente diferentes ($P < 0,05$) de acordo com o teste SNK. Letras maiúsculas diferentes denotam diferenças significativas entre as concentrações de sulfato de ferro em cada pH. Letras minúsculas diferentes denotam diferenças significativas entre os pHs em cada concentração de sulfato de ferro. (n= 4)

**Concentração dos nutrientes Ca, K, Mg, P, S e N em g.kg⁻¹ de MS. Concentração dos nutrientes B, Cu, Fe, Mn, Mo e Zn em mg.kg⁻¹ de MS.

No caule de mudas mantidas em pH 5,5 verificou-se um aumento significativo do elemento Fe com o aumento nas concentrações de sulfato de ferro, com concentração significativamente maior em raízes mantidas à 10 mM, sendo maior concentração de Fe observado em pH 3,0 em relação ao pH 5,5. Em pH 5,5 verificou-se menor acúmulo do Fe em mudas mantidas nos tratamentos controle, 2,5 e 5 mM de sulfato de ferro, comparativamente com pH 3,0.

A concentração de Mo aumentou significativamente no caule das mudas tratadas com as concentrações de 5 e 10 mM de sulfato de ferro em pH 3,0, porém, no pH 5,5 reduziu significativamente com o aumento das concentrações de sulfato de ferro. Adicionalmente, mudas mantidas no pH 3,0 apresentaram menor acúmulo de B, e Mo nos tratamentos controle e 2,5 mM de sulfato de ferro comparativamente ao pH 5,5 (Tabela 3).

Tabela 3 Composição mineral em caules de mudas micropropagadas de *Cedrela fissilis* durante 60 dias de incubação em diferentes concentrações de sulfato de ferro em pH 3,0 e 5,5.

		FeSO ₄ (mM)									
		Micronutrientes (mg Kg ⁻¹)				Macronutrientes (g Kg ⁻¹)					
pH		0,0019	2,5	5,0	10	0,0019	2,5	5,0	10		
		Caule				Caule					
B	3,0	6,83bA	8,65bA	7,27bA	7,27bA	Ca	3,0	4,82aA	3,17aA	5,21aA	4,02aA
	5,5	11,91aA	14,03aA	12,66aA	12,66aA		5,5	4,06aA	4,60aA	4,72aA	3,90aA
	CV (%)	18,53					CV (%)	21,87			
Cu	3,0	3,46aA	2,02aA	3,57aA	3,06aA	K	3,0	20,58aA	18,52aA	20,97aA	17,83aA
	5,5	2,88aA	2,67aA	3,06aA	2,04aA		5,5	18,10aA	18,52aA	22,50aA	19,15aA
	CV (%)	32,38					CV (%)	16,51			
Fe	3,0	14,32aA	14,08aA	16,91aA	14,13aA	Mg	3,0	2,09aA	1,64aA	2,23aA	1,89aA
	5,5	2,86bC	7,50bB	6,17bBC	13,89aA		5,5	1,91aA	1,91aA	1,93aA	2,04aA
	CV (%)	21,21					CV (%)	16,01			
Mn	3,0	11,09aA	13,53aA	18,87aA	15,57aA	P	3,0	2,02aA	1,64aA	1,72aA	1,40aA
	5,5	13,60bA	20,21aA	18,32aA	18,85aA		5,5	1,82aA	1,86aA	1,82aA	1,47aA
	CV (%)	21,18					CV (%)	27,67			
Mo	3,0	0,034bB	0,038bB	0,100aA	0,097aA	S	3,0	0,68aA	0,65aA	0,76aA	0,76aA
	5,5	0,160aA	0,077aB	0,089aB	0,090aB		5,5	0,59aA	0,70aA	0,72aA	0,70aA
	CV (%)	23,43					CV (%)	18,77			
Zn	3,0	8,25aA	7,31aA	8,28aA	8,46aA	N	3,0	4,50aA	4,43aA	4,83aB	4,54aA
	5,5	9,73aA	9,99aA	9,79aA	8,47aA		5,5	5,25aA	5,53aA	5,82aA	5,08aA
	CV (%)	23,14					CV (%)	10,77			

* Médias seguidas por letras diferentes são significativamente diferentes ($P < 0,05$) de acordo com o teste SNK. Letras maiúsculas diferentes denotam diferenças significativas entre as concentrações de sulfato de ferro em cada pH. Letras minúsculas diferentes denotam diferenças significativas entre os pHs em cada concentração de sulfato de ferro. (n= 4)

**Concentração de nutrientes Ca, K, Mg, P, S e N em g.kg⁻¹ de MS. Concentração de nutrientes B, Cu, Fe, Mn, Mo e Zn em mg.kg⁻¹ de MS.

Nas folhas não verificou-se diferenças significativas para os nutrientes avaliados, incluindo Fe, exceto para a concentração de Mo, o qual diferiu significativamente em mudas incubadas no pH 5,5 com o aumento das concentrações de sulfato de ferro usadas em relação ao controle. O pH 5,5 apresentou menor acúmulo do Mo em mudas no tratamento controle. Por outro lado, a concentração de N foi menor em folhas de mudas mantidas nos tratamentos controle, 2,5 e 5 mM de sulfato de ferro em pH 5,5 comparativamente ao pH 3,0. O Fe é o micronutriente essencial para a síntese de clorofila (J. F. Briat et al., 1995), e 80% do ferro nas células vegetais é encontrado nos cloroplastos, sugerindo que haja acúmulo desse metal nas folhas de plantas cultivadas em condições de excesso deste micronutriente (Hänsch & Mendel, 2009).

Contrariamente, no presente estudos verificou-se um acúmulo significativo de ferro nas raízes comparativamente ao caule e folhas, e não foi observado nenhum distúrbio nutricional nas folhas, indicando um possível mecanismo controle na translocação e acumulação de nutrientes em *C. fissilis*.

Tabela 4 - Composição mineral em folhas de mudas micropropagadas de *cedrela fissilis* aos 60 dias de tratamento em diferentes concentrações de sulfato de ferro em pH 3,0 e 5,5.

		FeSO ₄ (mM)									
		Micronutrientes (mg Kg ⁻¹)				Macronutrientes (g Kg ⁻¹)					
pH		0,0019	2,5	5,0	10	0,0019	2,5	5,0	10		
		Folhas				Folhas					
B	3,0	29,81aA	41,12aA	30,21aA	36,59aA	Ca	3,0	13,72aA	11,01aA	14,07aA	12,8aA
	5,5	34,03aA	41,84aA	37,97aA	44,21aA		5,5	12,63aA	13,47aA	14,83aA	12,3aA
	CV (%)		23,89				CV (%)		22,21		
Cu	3,0	3,21aA	2,80aA	3,45aA	3,58aA	K	3,0	25,27aA	22,66aA	24,23aA	21,54aA
	5,5	2,64aA	3,99aA	3,17aA	2,52aA		5,5	25,08aA	20,18aA	25,60aA	25,22aA
	CV (%)		22,83				CV (%)		19,43		
Fe	3,0	74,79aA	76,21aA	81,24aA	95,74aA	Mg	3,0	4,71aA	4,15aA	4,47aA	4,28aA
	5,5	74,18aA	85,11aA	87,58aA	100,18aA		5,5	4,68aA	4,82aA	4,78aA	4,49aA
	CV (%)		22,71				CV (%)		15,01		
Mn	3,0	62,34aA	83,97aA	68,56aA	78,88aA	P	3,0	1,98aA	1,59aA	1,89aA	1,58aA
	5,5	65,22aA	91,23aA	64,75aA	75,55aA		5,5	2,01aA	1,57aA	1,58aA	1,63aA
	CV (%)		24,95				CV (%)		19,64		
Mo	3,0	0,159aA	0,169aA	0,182aA	0,205aA	S	3,0	2,31aA	2,16aA	2,32aA	2,61aA
	5,5	0,077bB	0,170aA	0,241aA	0,169aA		5,5	1,80aA	1,87aA	2,26aA	2,42aA
	CV (%)		28,44				CV (%)		26,03		
Zn	3,0	14,82aA	16,63aA	16,35aA	23,10aA	N	3,0	15,49aA	16,31aA	16,18aA	17,21aA
	5,5	16,94aA	20,19aA	19,03aA	17,78aA		5,5	14,86bA	16,81bA	16,39bA	19,37aA
	CV (%)		21,15				CV (%)		7,67		

* Médias seguidas por letras diferentes são significativamente diferentes ($P < 0,05$) de acordo com o teste SNK. Letras maiúsculas diferentes denotam diferenças significativas entre as concentrações de sulfato de ferro em cada pH. Letras minúsculas diferentes denotam diferenças significativas entre os pHs em cada concentração de sulfato de ferro. (n= 4).

**Concentração de nutrientes Ca, K, Mg, P, S e N em g.kg⁻¹ de MS. Concentração de nutrientes B, Cu, Fe, Mn, Mo e Zn em mg.kg⁻¹ de MS.

6. RESUMO E CONCLUSÕES

A partir deste estudo foram obtidos resultados inéditos e importantes sobre o efeito do sulfato de ferro e pH na germinação e no crescimento de mudas micropropagadas de *C. fissilis*.

Na germinação, verificou-se que as concentrações de sulfato de ferro e pH afetaram significativamente a germinação, sendo maior o efeito negativo em meio ácido, afetando os parâmetros de crescimento de raiz e a morfologia, reduzindo assim o acúmulo de biomassa. Ademais, o conteúdo endógeno de PAs foi afetado pelas concentrações de sulfato de ferro, com maior conteúdo de PAs na parte aérea comparativamente com a raiz. Verificou-se alteração na absorção de nutrientes em condições tóxicas o Fe, Mn, Zn, Ca, S atingiram altos níveis em plântulas com 8 mM e reduziram o Mo em 4 e 8 mM na raiz, nas folhas o S aumentou em 8 mM e reduziu o Mg em 4 e 8 mM. A partir dos resultados obtidos pode-se sugerir que em condições elevadas de sulfato de ferro (ou seja, acima de 4 mM) ocorre a redução significativa da germinação assim como redução no crescimento das plântulas, sugerindo que o uso de sementes pode não ser ideal como forma de reflorestar áreas com elevadas quantidades de ferro no solo, pois sua eficácia na germinação pode ser inibida.

No crescimento de mudas micropropagadas não verificou-se efeito significativo das concentrações de sulfato de ferro e pH, sobre o crescimento. Nas condições testadas, a biomassa da planta e os parâmetros importantes de fotossíntese como a fluorescência e teor relativo de clorofila não foram afetados significativamente. O maior acúmulo de PAs ocorreu na parte aérea comparativamente à raiz, enquanto a concentração de macro e micronutrientes tiveram maior alteração na raiz, diminuindo no caule. Foi evidenciando uma adaptação das mudas à toxicidade ao ferro, possivelmente pela ação antioxidante das PAs, as quais podem atuar na redução de espécies reativas de oxigênio, em que não é observado nenhum impacto nas folhas. Embora as concentrações de sulfato de ferro tenham afetado o estado nutricional em raízes das mudas micropropagadas de *C. fissilis*, estas não foram o suficiente para alterar os padrões de crescimento da planta. Neste sentido, sugere-se que a utilização de mudas micropropagadas de *C. fissilis* em áreas com o manuseio do minério de ferro pode ser importante para a recomposição da vegetação, visto que as altas concentrações desse nutriente na forma de sulfato de ferro (10 mM) não afetaram significativamente o desenvolvimento das mudas quando expostas durante 60 dias de incubação.

Estes resultados são inéditos para esta espécie, e futuros estudos visando entender o mecanismo pelo qual as mudas micropropagadas toleram o crescimento em altas concentrações de ferro são fundamentais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aasim, M., Khawar, K. M., Özcan, S. (2008). In vitro micropropagation from shoot meristems of Turkish cowpea (*Vigna unguiculata* L.) cv. Akkiz. *Bangladesh Journal of Botany*, 37(2), 149-154.
- Adamski, J. M., Peters, J. A., Danieloski, R., Bacarin, M. A. (2011). Excess iron-induced changes in the photosynthetic characteristics of sweet potato. *Journal of plant physiology*, 168(17), 2056-2062.
- Alcázar, R., Marco, F., Cuevas, J. C., Patron, M., Ferrando, A., Carrasco, P., . . . Altabella, T. (2006). Involvement of polyamines in plant response to abiotic stress. *Biotechnology letters*, 28(23), 1867-1876.
- An, J., Zhou, Q., Sun, Y., Xu, Z. (2009). Ecotoxicological effects of typical personal care products on seed germination and seedling development of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Chemosphere*, 76(10), 1428-1434.
- Aragão, V. P. M., de Souza Ribeiro, Y. R., Reis, R. S., Macedo, A. F., Floh, E. I. S., Silveira, V., Santa-Catarina, C. (2016). In vitro organogenesis of *Cedrela fissilis* Vell.(Meliaceae): the involvement of endogenous polyamines and carbohydrates on shoot development. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 124(3), 611-620.
- Aragão, V. P. M., Reis, R. S., Silveira, V., Santa-Catarina, C. (2017). Putrescine promotes changes in the endogenous polyamine levels and proteomic profiles to regulate organogenesis in *Cedrela fissilis* Vellozo (Meliaceae). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 1-11.
- Araújo, T. O., de Freitas-Silva, L., Santana, B. V. N., Kuki, K. N., Pereira, E. G., Azevedo, A. A., da Silva, L. C. (2014). Tolerance to iron accumulation and its effects on mineral composition and growth of two grass species. *Environmental Science and Pollution Research*, 21(4), 2777-2784.
- Audebert, A., Fofana, M. (2009). Rice yield gap due to iron toxicity in West Africa.

- Journal of Agronomy and Crop Science*, 195(1), 66-76.
- Bansal, P., Sharma, P. (2000). Effect of Pb²⁺ and Cd²⁺ on respiration and mitochondrial electron transport chain in germinating pea seeds (*Pisum sativum* L.). *Indian J. Environ. Ecoplan*, 3, 249-254.
- Bansal, P., Sharma, P., Goyal, V. (2002). Impact of lead and cadmium on enzyme of citric acid cycle in germinating pea seeds. *Biologia plantarum*, 45(1), 125-127.
- Bauer, P., Hell, R. (2006). Translocation of iron in plant tissues *Iron nutrition in plants and rhizospheric microorganisms* (pp. 279-288): Springer.
- Becana, M., Moran, J., Iturbe-Ormaetxe, I. (1998). Iron-dependent oxygen free radical generation in plants subjected to environmental stress: toxicity and antioxidant protection. *Plant and Soil*, 201(1), 137-147.
- Becker, M., Asch, F. (2005). Iron toxicity in rice—conditions and management concepts. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 168(4), 558-573.
- Bewley, J. D. (1997). Seed germination and dormancy. *The plant cell*, 9(7), 1055.
- Boardman, N. t. (1977). Comparative photosynthesis of sun and shade plants. *Annual review of plant physiology*, 28(1), 355-377.
- Bouchereau, A., Aziz, A., Larher, F., Martin-Tanguy, J. (1999). Polyamines and environmental challenges: recent development. *Plant science*, 140(2), 103-125.
- Briat, J.-F., Duc, C., Ravet, K., Gaymard, F. (2010). Ferritins and iron storage in plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1800(8), 806-814.
- Briat, J.-F., Lebrun, M. (1999). Plant responses to metal toxicity. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences-Series III-Sciences de la Vie*, 322(1), 43-54.
- Briat, J. F., Fobis-Loisy, I., Grignon, N., Lobreáaux, S., Pascal, N., Savino, G., . . . Wuytswinkel, O. (1995). Cellular and molecular aspects of iron metabolism in plants. *Biology of the Cell*, 84(1-2), 69-81.
- Carvalho, P. E. R. (1994). *Espécies arbóreas de usos múltiplos na Região Sul do Brasil*. Paper presented at the Embrapa Florestas-Artigo em anais de congresso (ALICE).
- Casierra-Posada, F., Cortés-Bayona, J., Cutler, J. (2017). Effect of Iron Excess on Growth of Sisal Plants (*Furcraea hexapetala*) Wirkung des Eisenüberschusses auf das Wachstum von Sisalpflanzen (*Furcraea hexapetala*). *Gesunde Pflanzen*, 69(3), 123-129.
- Chatterjee, C., Gopal, R., Dube, B. (2006). Impact of iron stress on biomass, yield, metabolism and quality of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Scientia horticulturae*, 108(1), 1-6.
- Chen, S., Harmon, A. C. (2006). Advances in plant proteomics. *Proteomics*, 6(20), 5504-5516.
- Chugh, L., Sawhney, S. (1996). Effect of cadmium on germination, amylases and rate of respiration of germinating pea seeds. *Environmental Pollution*, 92(1), 1-5.
- Colombo, A., Joly, C. (2010). Brazilian Atlantic Forest lato sensu: the most ancient Brazilian forest, and a biodiversity *hotspot*, is highly threatened by climate change. *Brazilian Journal of Biology*, 70(3), 697-708.
- Connolly, E. L., Guerinot, M. L. (2002). Iron stress in plants. *Genome Biology*, 3(8), reviews1024.1021. doi:10.1186/gb-2002-3-8-reviews1024
- Costa Nunes, E., de Castilho, C. V., Moreno, F. N., Viana, A. M. (2002). In vitro culture of *Cedrela fissilis* Vellozo (Meliaceae). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 70(3), 259-268.

- Davis, B. D. (1977). Occurrence of α -amylase in the axis of germinating peas. *Plant physiology*, 60(4), 513-517.
- De Dorlodot, S., Lutts, S., Bertin, P. (2005). Effects of ferrous iron toxicity on the growth and mineral composition of an interspecific rice. *Journal of Plant Nutrition*, 28(1), 1-20.
- Dean, W. (1996). A ferro e Fogo—A História ea devastação da Mata Atlântica brasileira, Companhia das Letras. São Paulo, Brazil.
- Dobermann, A., Fairhurst, T. (2000). Nutrient disorders and nutrient management. *Potash and Phosphate Institute, Potash and Phosphate Institute of Canada and International Rice Research Institute, Singapore.*
- Edge, R., McGarvey, D., Truscott, T. (1997). The carotenoids as anti-oxidants—a review. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 41(3), 189-200.
- Fan, H. B., Wang, Y. H. (2000). Effects of simulated acid rain on germination, foliar damage, chlorophyll contents and seedling growth of five hardwood species growing in China. *Forest Ecology and Management*, 126(3), 321-329.
- Fang, W.-C., Wang, J.-W., Lin, C. C., Kao, C. H. (2001). Iron induction of lipid peroxidation and effects on antioxidative enzyme activities in rice leaves. *Plant Growth Regulation*, 35(1), 75-80.
- Fundação SOS Mata Atlântica. (2017). *Atlas dos Remanecentes Florestais da Mata Atlântica - 2015-2016*. Retrieved from <https://www.sosma.org.br/105842/estudo-inedito-traca-panorama-da-regeneracao-florestal-na-mata-atlantica/>
- Ghaly, A., Snow, A., Kamal, M., Monfared, S. (2008). Iron uptake and translocation by facultative and obligate wetland plants. *American Journal of Environmental Sciences*, 4(6), 608.
- Giri, C., Shyamkumar, B., Anjaneyulu, C. (2004). Progress in tissue culture, genetic transformation and applications of biotechnology to trees: an overview. *Trees*, 18(2), 115-135.
- Grantz, D., Garner, J., Johnson, D. (2003). Ecological effects of particulate matter. *Environment international*, 29(2), 213-239.
- Groppa, M. D., Zawoznik, M. S., Tomaro, M. L., Benavides, M. P. (2008). Inhibition of root growth and polyamine metabolism in sunflower (*Helianthus annuus*) seedlings under cadmium and copper stress. *Biological Trace Element Research*, 126(1-3), 246.
- Guerinot, M. L., Yi, Y. (1994). Iron: nutritious, noxious, and not readily available. *Plant physiology*, 104(3), 815.
- Gurzau, E. S., Neagu, C., Gurzau, A. E. (2003). Essential metals—case study on iron. *Ecotoxicology and environmental safety*, 56(1), 190-200.
- Hänsch, R., Mendel, R. R. (2009). Physiological functions of mineral micronutrients (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Mo, B, Cl). *Current opinion in plant biology*, 12(3), 259-266.
- IUCN. (2017). *The IUCN red list of threatened species*. Retrieved from <http://www.iucnredlist.org/>
- Jiang, Y., Yang, B., Harris, N. S., Deyholos, M. K. (2007). Comparative proteomic analysis of NaCl stress-responsive proteins in *Arabidopsis* roots. *Journal of experimental botany*, 58(13), 3591-3607.
- Jucoski, G. d. O., Cambraia, J., Ribeiro, C., Oliveira, J. A. d. (2016). Excess iron on growth and mineral composition in *Eugenia uniflora* L. *Revista Ciência Agronômica*, 47(4), 720-728.
- Kerbaui, G. B. (2004). *Fisiologia vegetal* (Vol. 7): Guanabara Koogan Rio de

Janeiro.

- Kim, S. A., Guerinot, M. L. (2007). Mining iron: iron uptake and transport in plants. *FEBS letters*, 581(12), 2273-2280.
- Krinsky, N. I., Yeum, K.-J. (2003). Carotenoid–radical interactions. *Biochemical and biophysical research communications*, 305(3), 754-760.
- Kuki, K. N., Oliva, M. A., Pereira, E. G. (2008). Iron ore industry emissions as a potential ecological risk factor for tropical coastal vegetation. *Environmental management*, 42(1), 111-121.
- Kuki, K. N., Oliva, M. A., Pereira, E. G., Costa, A. C., Cambraia, J. (2008). Effects of simulated deposition of acid mist and iron ore particulate matter on photosynthesis and the generation of oxidative stress in *Schinus terebinthifolius* Raddi and *Sophora tomentosa* L. *Science of the total environment*, 403(1-3), 207-214.
- Kusano, T., Berberich, T., Tateda, C., Takahashi, Y. (2008). Polyamines: essential factors for growth and survival. *Planta*, 228(3), 367-381.
- Kuznetsov, V. V., Radyukina, N., Shevyakova, N. (2006). Polyamines and stress: biological role, metabolism, and regulation. *Russian Journal of Plant Physiology*, 53(5), 583.
- Lei, G. J., Zhu, X. F., Wang, Z. W., Dong, F., Dong, N. Y., Zheng, S. J. (2014). Abscisic acid alleviates iron deficiency by promoting root iron reutilization and transport from root to shoot in *Arabidopsis*. *Plant, cell & environment*, 37(4), 852-863.
- Li, X., Ma, H., Jia, P., Wang, J., Jia, L., Zhang, T., . . . Wei, X. (2012). Responses of seedling growth and antioxidant activity to excess iron and copper in *Triticum aestivum* L. *Ecotoxicology and environmental safety*, 86, 47-53.
- Liu, H., Zhang, J., Christie, P., Zhang, F. (2008). Influence of iron plaque on uptake and accumulation of Cd by rice (*Oryza sativa* L.) seedlings grown in soil. *Science of the total environment*, 394(2-3), 361-368.
- Liu, J., Leng, X., Wang, M., Zhu, Z., Dai, Q. (2011). Iron plaque formation on roots of different rice cultivars and the relation with lead uptake. *Ecotoxicology and environmental safety*, 74(5), 1304-1309.
- Lopes, S., Oliva, M., Martinez, C. (2000). Impacto das imissões de dióxido de enxofre e deposição de material particulado de ferro em espécies vegetais de restinga: avaliação ecofisiológica. *Ecotoxicologia*, 53-71.
- Lorenzi, H. (1992). Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. *Nova Odessa: Editora Plantarum 352p.-col. illus.. Por Geog*, 4.
- Løvaas, E., Olsen, J. E. (1998). No induction of polyamines and radical scavenging antioxidants in *Nicotians tabaccum* exposed to iron excess, as investigated by the DPPH assay and differential spectroscopy. *Journal of plant physiology*, 153(3-4), 401-408.
- Majerus, V., Bertin, P., Lutts, S. (2007). Effects of iron toxicity on osmotic potential, osmolytes and polyamines concentrations in the African rice (*Oryza glaberrima* Steud.). *Plant science*, 173(2), 96-105.
- Majerus, V., Bertin, P., Lutts, S. (2009). Abscisic acid and oxidative stress implications in overall ferritin synthesis by African rice (*Oryza glaberrima* Steud.) seedlings exposed to short term iron toxicity. *Plant and Soil*, 324(1-2), 253.
- Marschner, H. (2011). *Marschner's mineral nutrition of higher plants*: Academic press.
- Mehraban, P., Zadeh, A. A., Sadeghipour, H. R. (2008). Iron toxicity in rice (*Oryza*

- sativa* L.), under different potassium nutrition. *Asian J Plant Sci*, 7(3), 251-259.
- Mihoub, A., Chaoui, A., El Ferjani, E. (2005). Biochemical changes associated with cadmium and copper stress in germinating pea seeds (*Pisum sativum* L.). *Comptes rendus biologiques*, 328(1), 33-41.
- Minocha, R., Smith, D. R., Reeves, C., Steele, K. D., Minocha, S. C. (1999). Polyamine levels during the development of zygotic and somatic embryos of *Pinus radiata*. *Physiologia Plantarum*, 105(1), 155-164.
- Mishra, S., Dubey, R. (2005). Heavy metal toxicity induced alterations in photosynthetic metabolism in plants. *Handbook of photosynthesis*, 2, 845-863.
- Mohammed, G. H., Zarco-Tejada, P., Miller, J. R. (2003). Applications of chlorophyll fluorescence in forestry and ecophysiology *Practical applications of chlorophyll fluorescence in plant biology* (pp. 79-124): Springer.
- Møller, I. M., Jensen, P. E., Hansson, A. (2007). Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 58, 459-481.
- MOROHASHI, Y. (1980). Development of mitochondrial activity in pea cotyledons following imbibition; influence of the embryonic axis. *Journal of experimental botany*, 31(3), 805-812.
- Moura, L. C., Titon, M., Miranda, N. A., Moreira, T. P., de Oliveira, M. (2012). *In vitro* multiplication and elongation of vinhatico (*Plathymenia reticulata*). *Scientia Forestalis*, 40(96), 499-505.
- Msilini, N., Zaghdoudi, M., Govindachary, S., Lachaâl, M., Ouerghi, Z., Carpentier, R. (2011). Inhibition of photosynthetic oxygen evolution and electron transfer from the quinone acceptor QA⁻ to QB by iron deficiency. *Photosynthesis research*, 107(3), 247-256.
- Murgia, I., Vazzola, V., Tarantino, D., Cellier, F., Ravet, K., Briat, J.-F., Soave, C. (2007). Knock-out of ferritin AtFer1 causes earlier onset of age-dependent leaf senescence in Arabidopsis. *Plant Physiology and Biochemistry*, 45(12), 898-907.
- Myers, N., Mittermeier, R. A., Mittermeier, C. G., Da Fonseca, G. A., Kent, J. (2000). Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, 403(6772), 853-858.
- Nawa, Y., Asahi, T. (1971). Rapid development of mitochondria in pea cotyledons during the early stage of germination. *Plant physiology*, 48(6), 671-674.
- Neves, N. R., Oliva, M. A., da Cruz Centeno, D., Costa, A. C., Ribas, R. F., Pereira, E. G. (2009). Photosynthesis and oxidative stress in the restinga plant species *Eugenia uniflora* L. exposed to simulated acid rain and iron ore dust deposition: potential use in environmental risk assessment. *Science of the total environment*, 407(12), 3740-3745.
- Nguyen, N. T., Hiep, N. D., Fujita, K. (2005). Iron enhances aluminum-induced leaf necrosis and plant growth inhibition in *Eucalyptus camaldulensis*. *Plant and Soil*, 277(1-2), 139-152.
- Nonogaki, H., Bassel, G. W., Bewley, J. D. (2010). Germination—still a mystery. *Plant science*, 179(6), 574-581.
- Obroucheva, N., Lityagina, S., Richter, A. (2006). Dynamics of carbohydrates in the embryo axes of horse chestnut seeds during their transition from dormancy to germination. *Russian Journal of Plant Physiology*, 53(6), 768-778.
- Oliveira, C. R. M., Oliva, M. A., Pereira, E. G. (2008). Efeito do Material

- Particulado de Ferro no Teor de Pigmentos de *Schinus terebinthifolius* Raddi. *Revista Brasileira de Biociências*, 5(S2), pg. 681-683.
- Paiva, H. N. d., Carvalho, J. G. d., Siqueira, J. O. (2002a). Índice de translocação de nutrientes em mudas de cedro (*Cedrela fissilis* Vell.) e de ipê-roxo (*tabebuia impetiginosa* (mart.) standl.) submetidas a doses crescentes de cádmio, níquel e chumbo.
- Paiva, H. N. d., Carvalho, J. G. d., Siqueira, J. O. (2002b). Teor de nutrientes em mudas de cedro (*Cedrela fissilis* Vell.) Submetidas a doses crescentes de níquel, em Solução nutritiva.
- Peixoto, G. L., Martins, S. V., Silva, A. D., Silva, E. (2004). Composição florística do componente arbóreo de um trecho de Floresta Atlântica na Área de Proteção Ambiental da Serra da Capoeira Grande, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. *Acta Botanica Brasilica*, 18(1), 151-160.
- Pence, V. C. (2010). The possibilities and challenges of in vitro methods for plant conservation. *Kew Bulletin*, 65(4), 539-547.
- Pereira, E. G., Oliva, M. A., Kuki, K. N., Cambraia, J. (2009). Photosynthetic changes and oxidative stress caused by iron ore dust deposition in the tropical CAM tree *Clusia hilariana*. *Trees*, 23(2), 277.
- Pereira, E. G., Oliva, M. A., Rosado-Souza, L., Mendes, G. C., Colares, D. S., Stopato, C. H., Almeida, A. M. (2013). Iron excess affects rice photosynthesis through stomatal and non-stomatal limitations. *Plant science*, 201, 81-92.
- Perez-Amador, M. A., Leon, J., Green, P. J., Carbonell, J. (2002). Induction of the arginine decarboxylase ADC2 gene provides evidence for the involvement of polyamines in the wound response in *Arabidopsis*. *Plant physiology*, 130(3), 1454-1463.
- Pi, N., Tam, N., Wong, M. (2010). Effects of wastewater discharge on formation of Fe plaque on root surface and radial oxygen loss of mangrove roots. *Environmental Pollution*, 158(2), 381-387.
- Pierangeli, M., Guilherme, L., Curi, N., Silva, M., Oliveira, L., Lima, J. (2001). Teor total e capacidade máxima de adsorção de chumbo em Latossolos brasileiros. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 25(2).
- Pijut, P. M., Beasley, R. R., Lawson, S. S., Palla, K. J., Stevens, M. E., Wang, Y. (2012). In vitro propagation of tropical hardwood tree species—A review (2001-2011).
- Pijut, P. M., Lawson, S. S., Michler, C. H. (2011). Biotechnological efforts for preserving and enhancing temperate hardwood tree biodiversity, health, and productivity. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 47(1), 123-147.
- Pinto, L. P., Bedê, L., Paese, A., Fonseca, M., Paglia, A., Lamas, I. (2006). Mata Atlântica Brasileira: os desafios para conservação da biodiversidade de um hotspot mundial. *Biologia da conservação: essências*. São Carlos: RiMa, 91-118.
- Polyakov, N. E., Kruppa, A. I., Leshina, T. V., Konovalova, T. A., Kispert, L. D. (2001). Carotenoids as antioxidants: spin trapping EPR and optical study. *Free Radical Biology and Medicine*, 31(1), 43-52.
- Pugh, R. E., Dick, D. G., Fredeen, A. L. (2002). Heavy metal (Pb, Zn, Cd, Fe, and Cu) contents of plant foliage near the Anvil Range lead/zinc mine, Faro, Yukon Territory. *Ecotoxicology and environmental safety*, 52(3), 273-279.
- Rahoui, S., Chaoui, A., El Ferjani, E. (2010). Reserve mobilization disorder in germinating seeds of *Vicia faba* L. exposed to cadmium. *Journal of Plant*

- Nutrition*, 33(6), 809-817.
- Rathore, J. S., Rai, M. K., Phulwaria, M., Shekhawat, N. (2014). A liquid culture system for improved micropropagation of mature *Acacia nilotica* (L.) Del. ssp. indica and ex vitro rooting. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, 84(1), 193-200.
- Reddy, K. R., DeLaune, R. D. (2008). *Biogeochemistry of wetlands: science and applications*: CRC press.
- Ribeiro, Y. (2015). Enraizamento ex vitro de brotações micropropagadas em *Cedrela fissilis* Vell.(Meliaceae). *Monografia (Licenciatura em Ciências Biológicas)-Campos dos Goytacazes-RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro-UENF*, 38p.
- Rouphael, Y., Colla, G., Bernardo, L., Kane, D., Trevisan, M., Lucini, L. (2016). Zinc excess triggered polyamines accumulation in lettuce root metabolome, as compared to osmotic stress under high salinity. *Frontiers in plant science*, 7, 842.
- Sahrawat, K. (2005). Iron toxicity in wetland rice and the role of other nutrients. *Journal of Plant Nutrition*, 27(8), 1471-1504.
- Santa-Catarina, C., Silveira, V., Guerra, M. P., Steiner, N., Macedo, A. F., Floh, E. I. S., dos Santos, A. L. W. (2006). The use of somatic embryogenesis for mass clonal propagation and biochemical and physiological studies in woody plants. *Plant Biology*, 1.
- Schutzendubel, A., Polle, A. (2002). Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *Journal of experimental botany*, 53(372), 1351-1365.
- Sena, C., Florestais, S. (2008). Colheita, Beneficiamento e Armazenamento. *MMA: Secretaria de Biodiversidade e Florestas. Departamento de Florestas. Programa Nacional de Florestas. Unidade de Apoio do PNF no Nordeste*.
- Sfaxi-Bousbih, A., Chaoui, A., El Ferjani, E. (2010). Copper affects the cotyledonary carbohydrate status during the germination of bean seed. *Biological Trace Element Research*, 137(1), 110-116.
- Shevyakova, N., Cheremisina, A., Kuznetsov, V. V. (2011). Phytoremediation potential of *Amaranthus hybrids*: antagonism between nickel and iron and chelating role of polyamines. *Russian Journal of Plant Physiology*, 58(4), 634-642.
- Silva, L. C., Oliva, M. A., Azevedo, A. A., De Araújo, J. M. (2006). Responses of restinga plant species to pollution from an iron pelletization factory. *Water, air, and soil pollution*, 175(1-4), 241-256.
- Siqueira-Silva, A. I., da Silva, L. C., Azevedo, A. A., Oliva, M. A. (2012). Iron plaque formation and morphoanatomy of roots from species of restinga subjected to excess iron. *Ecotoxicology and environmental safety*, 78, 265-275.
- Siwach, P., Gill, A. R. (2014). Micropropagation of *Ficus religiosa* L. via leaf explants and comparative evaluation of acetylcholinesterase inhibitory activity in the micropropagated and conventionally grown plants. *3 Biotech*, 4(5), 477-491.
- Smiri, M., Chaoui, A., El Ferjani, E. (2009). Respiratory metabolism in the embryonic axis of germinating pea seed exposed to cadmium. *Journal of plant physiology*, 166(3), 259-269.
- Smirnoff, N. (2005). Ascorbate, tocopherol and carotenoids: metabolism, pathway engineering and functions. *Antioxidants and reactive oxygen species in*

- plants*, 53-86.
- Smit, M. F., Van Heerden, P. D., Pienaar, J. J., Weissflog, L., Strasser, R. J., Krüger, G. H. (2009). Effect of trifluoroacetate, a persistent degradation product of fluorinated hydrocarbons, on *Phaseolus vulgaris* and *Zea mays*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 47(7), 623-634.
- Sousa, K. R., Aragão, V. P. M., Reis, R. S., Macedo, A. F., Vieira, H. D., de Souza, C. L. M., . . . Santa-Catarina, C. (2016). Polyamine, amino acid, and carbohydrate profiles during seed storage of threatened woody species of the Brazilian Atlantic Forest may be associated with seed viability maintenance. *Brazilian Journal of Botany*, 39(4), 985-995.
- St-Cyr, L., Campbell, P. G. (1996). Metals (Fe, Mn, Zn) in the root plaque of submerged aquatic plants collected in situ: relations with metal concentrations in the adjacent sediments and in the root tissue. *Biogeochemistry*, 33(1), 45-76.
- Strasser, R. J., Srivastava, A., Tsimilli-Michael, M. (2000). The fluorescence transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples. *Probing photosynthesis: mechanisms, regulation and adaptation*, 445-483.
- Streit, N. M., Canterle, L. P., Canto, M. W. d., Hecktheuer, L. H. H. (2005). The chlorophylls. *Ciência Rural*, 35(3), 748-755.
- Tadolini, B. (1988). The influence of polyamine-nucleic acid complexes on Fe²⁺ autoxidation. *Molecular and cellular biochemistry*, 83(2), 179-185.
- Taiz, L., Zeiger, E. (2006). *Fisiologia vegetal* (Vol. 10): Universitat Jaume I.
- Tomitori, H., Kashiwagi, K., Sakata, K., Kakinuma, Y., Igarashi, K. (1999). Identification of a gene for a polyamine transport protein in yeast. *Journal of Biological Chemistry*, 274(6), 3265-3267.
- Trolldenier, G. (1973). Secondary effects of potassium and nitrogen nutrition of rice: change in microbial activity and iron reduction in the rhizosphere. *Plant and Soil*, 38(2), 267-279.
- Valério, A. F., Watzlawick, L. F., Silvestre, R., Koehler, H. S. (2009). Determination of the basic density of cedro wood (*Cedrela fissilis* Vell.) along the stem. *Applied Research & Agrotechnology*, 1(1).
- Varotto, C., Maiwald, D., Pesaresi, P., Jahns, P., Salamini, F., Leister, D. (2002). The metal ion transporter IRT1 is necessary for iron homeostasis and efficient photosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 31(5), 589-599.
- Wong, M., Chan, K., Choy, C. (1978). The effect of the iron ore tailings on the coastal environment of Tolo Harbour, Hong Kong. *Environmental Research*, 15(3), 342-356.
- Yoshihara, T., Goto, F., Shoji, K., Kohno, Y. (2010). Cross relationships of Cu, Fe, Zn, Mn, and Cd accumulations in common japonica and indica rice cultivars in Japan. *Environmental and experimental botany*, 68(2), 180-187.
- Zhang, X., Zhang, F., Mao, D. (1999). Effect of iron plaque outside roots on nutrient uptake by rice (*Oryza sativa* L.): phosphorus uptake. *Plant and Soil*, 209(2), 187-192.
- Zhu, X. F., Wang, B., Song, W. F., Zheng, S. J., Shen, R. F. (2016). Putrescine alleviates iron deficiency via NO-dependent reutilization of root cell-wall Fe in *Arabidopsis*. *Plant physiology*, 170(1), 558-567.
- Zuraida, A., Sentoor, K. G., Ahmad, N., Syahirah, F. M., Ayu, N. O. (2017). Regeneration of *in Vitro* Shoot and Root Structure through Hormone Manipulation of Coconut (MATAG F2) Zygotic Embryos. *American Journal of Plant Sciences*, 8(03), 340.