

FLORINDA MARIA MARTINS GAMA

**MOVIMENTO E SINALIZAÇÃO DO FERRO EM PLANTAS COM
ESTRATÉGIA I**



UNIVERSIDADE DO ALGARVE

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

2017

FLORINDA MARIA MARTINS GAMA

**MOVIMENTO E SINALIZAÇÃO DO FERRO EM PLANTAS COM
ESTRATÉGIA I**

DOUTORAMENTO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS

ESPECIALIDADE EM AGRONOMIA

TRABALHO EFETUADO SOB A ORIENTAÇÃO DE:

MARIBELA FÁTIMA DE OLIVEIRA PESTANA CORREIA

GUSTAVO NUNO BARBOSA NOLASCO



UNIVERSIDADE DO ALGARVE

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

2017

MOVIMENTO E SINALIZAÇÃO DO FERRO EM PLANTAS COM ESTRATÉGIA I

DECLARAÇÃO DE AUTORIA DE TRABALHO

Declaro ser a autora deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.

Copyright Florinda Maria Martins Gama

A Universidade do Algarve reserva para si o direito, em conformidade com o disposto no Código do Direito de Autor e dos Direitos Conexos, de arquivar, reproduzir e publicar a obra, independentemente do meio utilizado, bem como de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição para fins meramente educacionais ou de investigação e não comerciais, conquanto seja dado o devido crédito ao autor e editor respetivos.



A presente Tese de Doutoramento
foi apoiada pela Fundação para a Ciência e
Tecnologia através da bolsa de
doutoramento SFRH/BD/89521/2012

AGRADECIMENTOS

Gostaria de dedicar as minhas mais sinceras palavras de agradecimento a todos que de algum modo contribuíram para a realização desta tese.

À Professora Doutora Maribela Pestana Correia, orientadora, expresso o meu mais profundo agradecimento pela orientação, dedicação, disponibilidade, amizade, apoio e todos os conhecimentos e ensinamentos transmitidos ao longo de todos os anos de trabalho conjunto. Agradeço ainda a sua atenção na revisão deste trabalho e todas as sugestões que contribuíram para o seu enriquecimento.

Ao Professor Doutor Gustavo Nuno Barbosa Nolasco, orientador, por ter aceitado a orientação desta dissertação, pelos conhecimentos transmitidos e cuja orientação deste trabalho foi sempre acompanhada por uma enorme disponibilidade. Agradeço ainda as sugestões e valiosas críticas na revisão da tese.

À Fundação para a Ciência e Tecnologia por me ter concedido a bolsa de doutoramento SFRH/BD/89521/2012 e pelos demais apoios financeiros que permitiram a concretização deste trabalho.

Aos que fazem parte da equipa do Laboratório de Nutrição Vegetal, ao Professor Doutor Pedro Correia agradeço toda a ajuda, rigor científico, amizade e sugestões dadas ao longo da realização deste trabalho. À Teresa Saavedra agradeço-te o apoio, sugestões e pelo excelente ambiente de trabalho que recordo com a maior estima. À equipa do Laboratório de Virologia pela transmissão de conhecimento e experiência essencial para a realização deste trabalho. Ao Professor José Paulo da Silva do Departamento de Química pela transmissão de conhecimento científico na sua área de investigação. Aos funcionários do Horto agradeço toda a ajuda prestada durante o decorrer dos ensaios.

Por fim não posso deixar de agradecer àqueles que me são mais íntimos e mais importantes, à minha família, aos meus pais, aos meus irmãos, à minha sobrinha e ao Norbert pelo apoio incondicional e momentos de alegria, pela constante motivação e mesmo nos momentos mais difíceis. Com a vossa ajuda foi possível superar os obstáculos que ao longo desta caminhada foram surgindo: a vós dedico este trabalho. Bem Hajam!

RESUMO

A deficiência de Fe provocou decréscimos no teor de clorofila total, acréscimos na atividade da QFR, alterações morfológicas a nível radicular, diminuição de absorção e translocação de Fe nos diferentes órgãos. No morangueiro o decréscimo do Fe incidiu nas raízes, na coroa e nas flores. No *Poncirus* o teor de Fe diminuiu nas raízes. Como alternativa à absorção de Fe ocorreu uma acumulação dos metais Zn, Mn e Cu especialmente nas raízes e folhas novas. No morangueiro os compostos orgânicos acumularam nas folhas velhas e jovens e diminuíram nas raízes. O pulso de Fe fornecido na solução nutritiva a plantas cloróticas de morangueiro levou à recuperação da deficiência em 12 dias. A partição de Fe foi direcionada para a coroa e para as flores, associado a acumulação de ácidos succínico e cítrico ao nível radicular e permitiu maior absorção de Fe.

Foram estudadas as alterações no mecanismo de resposta em plantas com o gene FRO1 silenciado. Em plantas silenciadas a deficiência de Fe levou à redução da expressão do gene, decréscimo da atividade QFR e diminuição na síntese de clorofila. Em *Nicotiana* o padrão de distribuição do Fe entre folhas velhas e jovens foi alterado e não foi possível recuperar as plantas silenciadas, as plantas não conseguiram retomar o metabolismo na síntese de clorofila nem ativar a enzima QFR.

Foi estudado o comportamento de porta-enxertos de *Poncirus* com a estratégia redutora e as adaptações fisiológica ativas quando transplantadas para solo calcário. Estas plantas apresentaram desempenho semelhante em relação às plantas que cresceram numa primeira fase sem limitação de Fe indicando que os mecanismos de adaptação e o aumento nutricional induzidos pela deficiência de Fe podem ser utilizados como uma ferramenta de defesa que contribuirá para as plantas tolerarem melhor as diferentes restrições do solo em condições de campo.

Palavras-chave: Deficiência de ferro, Nutrientes, Quelato de ferro redutase, Solo calcário, VIGS (*Virus induced gene silencing*).

ABSTRACT

Fe deficiency caused decreases in total chlorophyll, increases in ferric chelate reductase activity, morphological alterations at the root level and decreases in Fe absorption and translocation in different organs. In strawberry plants, Fe content decreased in the roots, the crown and the flowers. In *Poncirus*, the Fe content decreased in the roots. As an alternative to Fe absorption, an accumulation of Zn, Mn and Cu metals occurred especially in roots and young leaves. In strawberry organic compounds accumulated in mature and young leaves and lowered in the roots. The Fe pulse added to the nutrient solution of chlorotic strawberry plants led to Fe deficiency recovery after 12 days. Fe partitioning was directed to the crown and flowers, associated with the accumulation of succinic and citric acids at the root level, which allowed higher Fe absorption.

Changes to the response mechanism in plants with the FRO1 gene silenced were studied. In silenced plants, Fe deficiency led to reduced gene expression, decreased FCR activity and decreased chlorophyll synthesis. In *Nicotiana*, the pattern of Fe distribution between mature and young leaves was altered and silenced plants were unable to recover after Fe resupply, the plants were unable to resume chlorophyll synthesis nor activate the ferric chelate reductase enzyme.

The behaviour of *Poncirus* rootstocks with the reduction-based strategy induced was analysed when transplanted to calcareous soil. These plants presented similar performance in regard to plants that grew in a first stage with Fe sufficient conditions indicating that physiological and morphological adaptations and the nutritional increase induced by Fe deficiency can be used as a defence tool that may contribute to more tolerant plants to different soil environments under field conditions.

Keywords: Calcareous soil, Ferric chelate reductase, Iron deficiency, Nutrients, Virus induced gene silencing

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	vi
RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
LISTA DE ABREVIATURAS E ACRÓNIMOS	xii
CAPÍTULO 1	1
INTRODUÇÃO GERAL	1
1. O Ferro.....	2
2. Mecanismo de absorção do Fe	5
2.1. A estratégia I	6
2.1.1. Acidificação	6
2.1.2. Excreção de compostos fenólicos	7
2.1.3. Redução do Fe.....	8
2.1.4. O transporte do Fe para as células radiculares	10
2.2. A estratégia II	10
2.3. A hipótese da estratégia combinada.....	11
3. Transporte do Fe a longa distância: da raiz à parte aérea	11
3.1. O carregamento e descarregamento do xilema	12
3.2. O transporte do Fe no floema.....	13
3.3. O Fe nas folhas	13
4. Movimento e sinalização do Fe.....	14
5. Sintomas da deficiência de Fe	15
6. A partição dos nutrientes na deficiência de Fe	18
7. Os ácidos orgânicos e a deficiência de Fe	19
8. Silenciamento génico induzido por vírus	21
9. Objetivos globais	23
CAPÍTULO 2	25
MATERIAL E MÉTODOS	25
2.1. Enquadramento	26
2.2. Material vegetal	26
2.3. Solução nutritiva	28
2.4. Quantificação da clorofila total.....	29
2.5. Crescimento vegetativo e avaliação da biomassa.....	32
2.6. Composição mineral.....	33
2.7. Atividade da quelato de Fe(III)-redutase (QFR)	34

2.8. Quantificação e extração dos ácidos orgânicos	35
2.9. Construção do plasmídeo TRV2-FRO1	36
2.10. Silenciamento génico induzido por vírus (VIGS)	38
2.11. Detecção do vetor TRV	39
2.12. Extração e quantificação de RNA por qRT-PCR	41
2.13. Caracterização física e química do solo.....	42
2.14. Análise estatística.....	43
CAPÍTULO 3	45
A MEMÓRIA DO STRESS: DEFICIÊNCIA DE FERRO EM MORANGUEIRO	45
3.1. Resumo.....	46
3.2 Delineamento experimental	46
3.3. Resultados	48
3.3.1. Concentração foliar de clorofila	48
3.3.2. Biomassa	50
3.3.3 Composição mineral.....	52
3.3.4. Atividade da QFR.....	55
3.3.5. Ácidos orgânicos.....	56
3.4. Discussão	59
3.5. Conclusão	61
3.6. Agradecimentos	62
CAPÍTULO 4	63
SILENCIAMENTO DO GENE FRO1	63
4.1. Resumo.....	64
4.2. Ensaio 1 – <i>Nicotiana benthamiana</i>	65
4.2.1. Delineamento experimental	65
4.2.2 Resultados	66
4.3. Ensaio 2 – <i>Lycopersicon esculentum</i>	75
4.3.1 Delineamento experimental	75
4.3.2 Resultados	76
4.4. Discussão	85
4.5. Conclusão	89
4.6. Agradecimentos	90
CAPÍTULO 5	91
A INDUÇÃO DE DEFICIÊNCIA DE FERRO NO PORTA-ENXERTO <i>PONCIRUS TRIFOLIATA</i> E O DESEMPENHO FISIOLÓGICO APÓS O TRANSPLANTE PARA O SOLO	91
5.1. Resumo.....	92

5.2. Delineamento experimental	93
5.2.1. Fase I – Ensaio em solução nutritiva	94
5.2.2. Fase II – Solo calcário.....	95
5.3 Resultados	96
5.3.1. Fase I.....	96
5.3.2. Fase II.....	100
5.4. Discussão.....	106
5.5. Conclusões.....	110
5.6. Agradecimentos	111
CAPÍTULO 6	112
CONCLUSÕES GERAIS	112
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	112
ANEXOS	112

LISTA DE ABREVIATURAS E ACRÓNIMOS

ALA	Ácido aminolevulínico
AUX1	Auxina
bHLH	Proteína hélice- <i>loop</i> -hélice
BPDS	Dissulfonato de batofenantrolina
CaCO ₃	Carbonato de cálcio
CE	Condutividade elétrica
CTC	Capacidade de troca catiónica
DAS-ELISA	Imunoabsorção enzimática de dupla sanduiche
DIE	Diluição isotópica estável
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ECA	Equivalente do carbonato de cálcio ativo
EDTA	Ácido etileno diamino tetra-acético
EST	Marcador de sequência expressa
FCR	<i>Ferric chelate reductase</i>
Fe	Ferro
Fe _d	Fe extraível com Citrato/bicarbonato/ditionite
Fe-EDDHA	Ácido etileno-diamina di-orto-hidroxi-fenil de ferro
Fe _{ox}	Óxidos de Fe extraível
FER	<i>Gene encoding bHLH protein and putative transcription factor</i>
Fe-S	Sulfoproteínas
FIT	<i>Fer-like Iron Deficiency Induced Transcription Factor</i>
FRO	<i>Ferric reductase oxidase</i>
FS	Fitosideróforos
GDI	Gene de interesse
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
HA	H ⁺ -ATPase
HCO ₃ ⁻	Ião bicarbonato
IDEF1	<i>Fe deficiency-responsive elements</i>
IREG / FPN	Ferroportina
IRT	<i>Iron Regulated Transporter</i>
LB	<i>Luria Bertani</i>
LC-MS	<i>Liquid chromatography – mass spectrometry</i>
MA	Ácido muginéico
MÊS	Ácido 2-(N- morfolino)etanossulfônico
MIT	<i>Mitochondrial Iron Transporter</i>
MP	Membrana plasmática
mRNA	RNA mensageiro
NA	Nicotianamina
NADH	Nicotinamina-adenina-dinucleótido reduzido
NADPH	Nicotinamina-adenina-dinucleótido-fosfato reduzido
NAS4	Nicotianamina sintetase

NRAMP	<i>Natural Resistance-Associated Macrophage Protein</i>
OPT	Transportadores de oligopéptidos
pb	Pares de bases
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PEPC	Fosfoenolpiruvato carboxilase
PF	Peso fresco
PIC	Transportador <i>permease in chloroplasts</i>
PS	Peso seco
PTFE	Politetrafluoretileno
PTGS	Silenciamento génico pós-transcricional
QFR	Quelato de Fe(III)-redutase
RNA	Ácido ribonucleico
TCA	Ácido tricarboxílico
TOM	Transportador de ácido muginéico
TRV	<i>Tobacco Rattle Vírus</i>
VIGS	<i>Virus induced gene silencing</i>
VS	Via secretória
YS1	Proteína <i>Yellow Stripe1</i>
YSL	<i>Yellow Stripe Like</i>
ZIP	Proteínas transportadoras de Fe e de Zn
ZRT	<i>Zinc regulated transporter</i>

CAPÍTULO 1

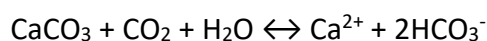
INTRODUÇÃO GERAL

1. O Ferro

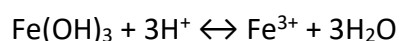
O ferro (Fe) é um micronutriente essencial para a vida. As plantas são a primeira fonte de Fe de elevada importância para a alimentação humana.

Nos solos, o Fe é o quarto elemento mais abundante da litosfera, mas existe principalmente em formas não disponíveis na solução do solo não podendo ser absorvido pelas plantas. O Fe é um constituinte de minerais primários, como os silicatos de ferromagnesianos, que através dos processos de meteorização libertam Fe para a solução do solo. Este pode ser usado pelos microrganismos, ficar ligado a material orgânico ou a minerais secundários como a argila e os óxidos ou hidróxidos de Fe (Chen e Barak, 1982). O Fe é um metal de transição que tem a capacidade de aceitar e doar elétrons ($\text{Fe}^{3+} + e^- \leftrightarrow \text{Fe}^{2+}$). A proporção de Fe reduzido (também designado por ferroso; Fe^{2+}) ou oxidado (também denominado por férrico; Fe^{3+}) e a consequente biodisponibilidade para as plantas depende da reação e do potencial redox do solo. Por exemplo, em solos alagados o Fe existe principalmente na forma reduzida e está muito acessível para as plantas absorverem enquanto nos solos alcalinos prevalece a forma Fe^{3+} que forma óxidos de solubilidade extremamente baixa (Loeppert, 1986).

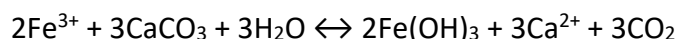
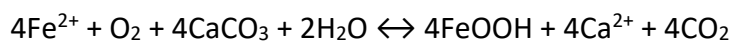
No caso dos solos calcários, a biodisponibilidade do Fe é muito limitada, o que constitui um dos principais fatores indutores da clorose férrica. Os solos calcários ocorrem preferencialmente nas regiões áridas e semiáridas e caracterizam-se por apresentar valores de pH entre 7.4 e 8.5, associados a uma baixa percentagem de matéria orgânica (<1%), elevadas concentrações de carbonatos de cálcio e de magnésio (CaCO_3 ; MgCO_3) e predominando os óxidos de Fe como a goetite (FeO(OH)) e a hematite (Fe_2O_3) (Marschner *et al.*, 1986). Nestes solos, a elevada concentração de CaCO_3 regula a concentração do ião bicarbonato (HCO_3^-) pela sua hidrólise na presença de dióxido de carbono (Loeppert, 1986):



O ião HCO_3^- produz um efeito tampão que diminui a solubilidade dos óxidos de Fe como é possível observar na seguinte reação (Loeppert, 1986):



Deste modo o ião bicarbonato (HCO_3^-) é considerado o principal facto indutor da clorose férrica em solos calcários e alcalinos (Lucena *et al.*, 2007; Mengel *et al.*, 1984). A solubilidade do Fe na solução do solo diminui cerca de 1000 vezes por cada incremento de uma unidade no valor de pH porque os iões ferrosos e férricos reagem rapidamente com o CaCO_3 e produzem óxidos de Fe de baixa solubilidade (Loeppert, 1986):



Para um crescimento ótimo, as plantas necessitam de uma concentração de Fe entre 10^{-9} a 10^{-4} M mas mesmo em solos bem arejados, a disponibilidade de Fe^{3+} e Fe^{2+} chega a ser inferior a 10^{-15} M (Marschner e Rimmington, 1988). Nestas condições, o Fe deixa de estar acessível para as plantas absorverem e conseqüentemente estas desenvolvem sintomas de deficiência de Fe, habitualmente designados por clorose férrica (Guerinot e Yi, 1994; Hindt e Guerinot, 2012). Devido à baixa mobilidade de Fe no floema, os sintomas iniciam-se nas folhas mais jovens com uma clorose internervuras que, com o agravar da deficiência, progride generalizando-se por toda folha, registando-se decréscimos acentuados nos teores foliares de clorofila (Larbi *et al.*, 2006; Pestana *et al.*, 2003; Rombolà *et al.*, 2003). Caso o problema persista pode ocorrer a descoloração total das folhas seguida de necrose foliar. A deficiência de Fe é um problema nutricional de elevada dimensão e com bastante impacto pois afeta numerosas espécies agrícolas. As perdas na produção dependem da sensibilidade de cada cultivar, e em casos extremos pode mesmo ocorrer a perda total da cultura.

Estima-se que um terço das culturas de todo o mundo esteja instalado em solos calcários (Mori, 1999). Na região do Mediterrâneo, a incidência da clorose férrica está generalizada e afeta entre 20% a 50% das árvores de fruto, resultando na afetação das taxas fotossintéticas, na paragem do crescimento vegetativo, em desequilíbrios nutricionais, no decréscimo na qualidade do fruto, e por fim, na diminuição da produção e em produtividades baixas (Álvarez-Fernández *et al.*, 2011; Pestana *et al.*, 2003; Rombolà e Tagliavini, 2006).

Devido à capacidade que este elemento apresenta para mudar de estado de oxidação-redução, o Fe participa em diversos processos enzimáticos durante o desenvolvimento

das plantas, como na fotossíntese, na respiração, na fixação do N₂ atmosférico, na biossíntese da clorofila e de diversas fitohormonas (Jeong e Connolly, 2009; Kobayashi e Nishizawa, 2012). O Fe é constituinte de diversas enzimas que estão envolvidas na cadeia transportadora de eletrões, no ciclo do ácido cítrico e em processos que ocorrem em diversos organelos celulares como, nos cloroplastos e nas mitocôndrias (Jeong e Connolly, 2009; Kobayashi e Nishizawa, 2012). Dependendo do tipo de ligando, estas enzimas são agrupadas em sulfoproteínas (Fe-S), heme proteínas e fitoferritina. Por exemplo, os citocromos são heme proteínas e estão envolvidos na cadeia transportadora de eletrões. Além disso, a enzima mais importante e responsável pela redução do Fe é a quelato de Fe(III)redutase (QFR) que contém dois grupos heme que possibilitam a passagem de eletrões através das membranas celulares (Robinson *et al.*, 1999). Outro exemplo de uma enzima com um grupo heme é a catalase que coordena a reação de transformação do peróxido de oxigénio em água e oxigénio. A ferredoxina foi uma das primeiras enzimas Fe-S a ser descrita (Hall *et al.*, 1966). As ferritinas pertencem a um grupo de macro proteínas que se encontram nos plastídios e estão envolvidas na homeostase do Fe (Harrison e Arosio, 1996). Este equilíbrio do Fe livre é muito importante pois nesta forma é reativo e através da reação de Fenton leva à acumulação de radicais livres do grupo hidroxilo que são espécies reativas de oxigénio as quais são citotóxicas e causam danos celulares (Brumbarova *et al.*, 2015; Marschner e Rimmington, 1988). Em conclusão, o Fe quando em excesso, é integrado na ferritina permanecendo deste modo armazenado nas células vegetais e evitando simultaneamente os níveis fitotóxicos da forma iónica.

A anemia por falta de Fe é uma das deficiências mais frequentes na população humana e não apenas um problema dos países em desenvolvimento. Estima-se que pelo menos 30% da população mundial (em algumas partes do mundo poderá atingir valores acima dos 50%) possa vir a sofrer desta deficiência, sendo que as crianças e as mulheres em idade fértil são os alvos mais suscetíveis (Vasconcelos *et al.*, 2017; Zielińska-Dawidziak, 2015).

Deste modo, o conhecimento dos mecanismos de absorção, de transporte e de regulação do Fe quer a nível celular como de toda a planta é essencial para melhorar a

qualidade e a produtividade das culturas e contribuir para o fornecimento de alimentos mais saudáveis a nível mundial.

2. Mecanismo de absorção do Fe

Como o Fe é simultaneamente essencial e nocivo para o metabolismo da planta, a concentração e a sua distribuição nos vários órgãos e tecidos devem ser muito bem equilibradas e dentro dos limites fisiológicos, de modo a assegurar as quantidades adequadas para os processos metabólicos e para a sobrevivência das plantas (Guerinot e Yi, 1994). A regulação da absorção de Fe é um processo inicial essencial à manutenção da homeostase de Fe nas plantas.

Para que o Fe possa ser absorvido da rizosfera e transportado para toda a planta são necessários diversos transportadores e enzimas. Este processo é complexo e começa no apoplasto das células epidérmicas da raiz. Inicialmente, o Fe^{3+} presente na solução do solo é reduzido pela enzima QFR existente membrana plasmática da raiz, sendo simultaneamente transferido um eletrão do NADPH (nicotinamina-adenina-dinucleótido-fosfato reduzido) ou NADH (nicotinamina-adenina-dinucleótido reduzido) do citosol para o apoplasto (Schmidt e Janiesch, 1991). O Fe reduzido (Fe^{2+}) pode agora ser absorvido pela raiz onde é quelatado pela nicotianamina (NA), movimentando-se radialmente através das células do córtex até atingir o xilema (Takahashi *et al.*, 2003).

Em condições de deficiência de Fe, as plantas superiores desenvolveram duas estratégias para facilitar a aquisição e aumentar a absorção de Fe: a estratégia redutora, na qual as plantas reduzem o Fe^{3+} antes da absorção e a estratégia complexante em que o Fe^{3+} livre é quelatado antes de ser absorvido. Estas estratégias foram descritas pela primeira vez por (Romheld e Marschner, 1986) e são conhecidas como estratégia I e estratégia II, respetivamente. A estratégia baseada na redução ocorre em espécies de dicotiledóneas e monocotiledóneas, com exceção das gramíneas, enquanto a estratégia II é confinada às gramíneas.

2.1. A estratégia I

Em condições onde a biodisponibilidade de Fe é limitada, as plantas da estratégia I induzem uma resposta coordenada que inclui: a acidificação da rizosfera para solubilizar mais Fe; a excreção de compostos fenólicos que quelatam o Fe; a redução do Fe³⁺ para Fe²⁺ pela enzima QFR; e finalmente o transporte do Fe reduzido para o citoplasma radicular (**Figura 1.1**).

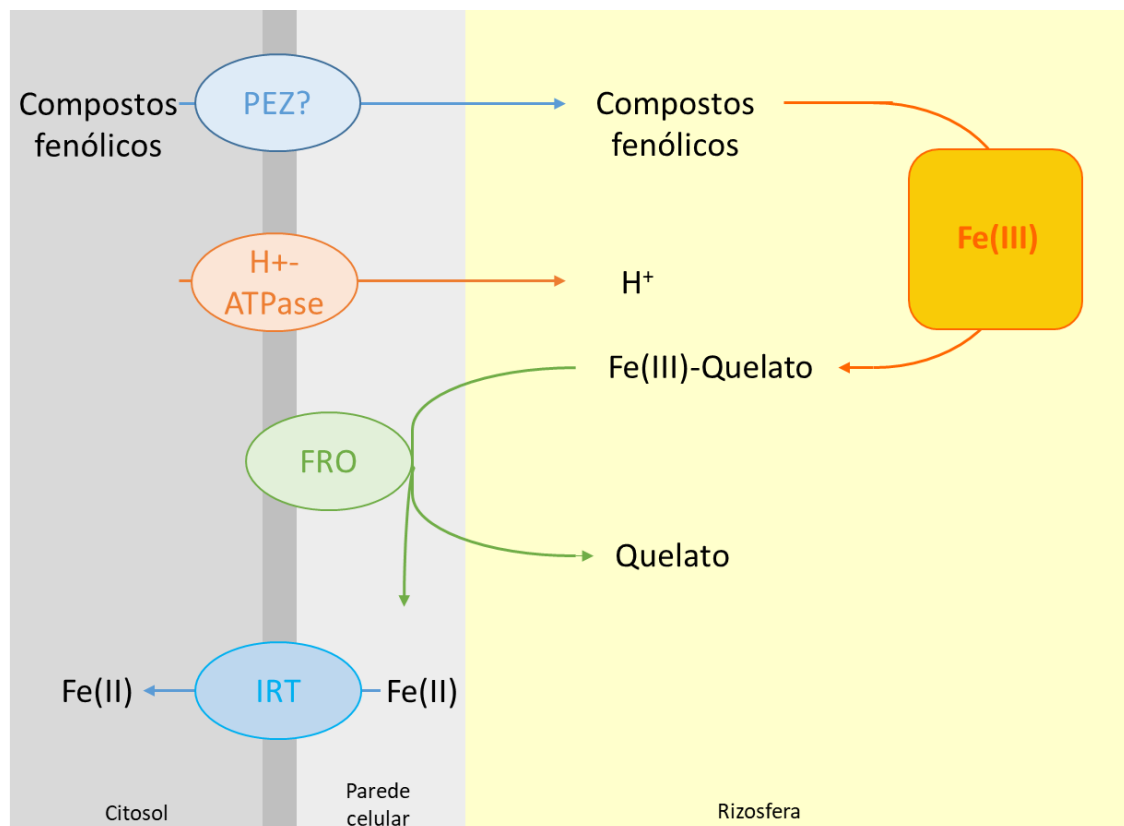


Figura 1.1. Mecanismo de absorção do Fe nas raízes das plantas da estratégia I. Adaptado de Kobayashi e Nishizawa (2012). Abreviaturas: FRO, *feric reductase oxidase*; IRT, *iron regulated transporter*; PEZ, *Phenolics efflux zero*. Cores identificam diferentes organelos, transportadores ou enzimas envolvidas neste mecanismo de resposta à deficiência de Fe.

2.1.1. Acidificação

A acidificação da rizosfera ocorre pela ação da bomba de prótons H⁺-ATPase (gene HA) com extrusão de íons de hidrogénio (H⁺), acidificando o meio e conduzindo à libertação de Fe para a solução nutritiva. No entanto, este ajuste da reação do solo está confinado à superfície radicular, uma vez que as proteínas responsáveis por este processo estão

incorporadas nas células da epiderme da raiz. Pontualmente, a diminuição do pH circundante, pode possibilitar a liberação de Fe das partículas do solo. O CsHA1 e o AHA2 são exemplos destes genes HA que foram respectivamente identificados em plantas de pepino (Santi *et al.*, 2005) e em *Arabidopsis thaliana* (Santi e Schmidt, 2009), sendo ambos regulados pela deficiência de Fe.

2.1.2. Excreção de compostos fenólicos

Em condições de deficiência de Fe ocorre um aumento na excreção de metabolitos secundários, como ácidos orgânicos, compostos fenólicos, flavinas e flavonóides (Abadía *et al.*, 2011; Cesco *et al.*, 2010) para a rizosfera, o que possibilita aumentar a solubilidade do Fe quer pela quelatação do Fe³⁺ quer pela redução para a forma ferrosa. Estes processos são importantes na deficiência de Fe, particularmente na deficiência de Fe induzida por elevados valores de pH no meio exterior podendo, deste modo, auxiliar na absorção de Fe (Clemens e Weber, 2016).

Sob condições de deficiência, o Fe solúvel que vem das camadas externas da raiz via apoplasto pode ter uma importância fisiológica quando associado aos exsudados radiculares. No entanto, a integração dos diferentes passos da estratégia de redução ainda necessita de ser mais clarificada. Além disso, é aceite que o percurso de aquisição de Fe é favorecido especialmente quando Fe está em forma quelatada, sendo possível que esta via ocorra em condições naturais.

O tipo de metabolitos segregados parece ser geneticamente determinado. As cumarinas são compostos fenólicos observados em condições alcalinas em *Arabidopsis*. A escopoletina foi a primeira cumarina identificada como quelatante de Fe em *Arabidopsis* (Fourcroy *et al.*, 2014) e no *Trifolium pretense* - trevo vermelho (Jin *et al.*, 2007). As flavinas como agentes quelatantes foram identificados na *Nicotiana tabacum* (Vorwieger *et al.*, 2007) e no *Medicago truncatula* (Rodríguez-Celma *et al.*, 2011). Estes estudos indicaram que a secreção fenólica induzida pela deficiência de Fe está ligada à remobilização do Fe, aumentando a reutilização do Fe apoplásico e, portanto, melhorando a nutrição do Fe.

2.1.3. Redução do Fe

Como indicado anteriormente, uma vez solubilizado, o Fe existe principalmente na forma férrica (Fe^{3+}) que deve ser reduzido à forma ferrosa (Fe^{2+}) antes de poder ser transportado para dentro da raiz. Esta redução também ocorre na membrana plasmática na superfície radicular, onde o gene FRO (*ferric reductase oxidase*) da família das metaloredutases codifica a enzima QFR que transfere um eletrão da NADPH através da membrana plasmática (Robinson *et al.*, 1999). Em condições deficientes em Fe, a expressão da enzima QFR é induzida (Connolly *et al.*, 2003). A primeira vez que o gene FRO2 foi clonado foi a partir de *Arabidopsis* (Robinson *et al.*, 1999) e desde de então têm vindo a ser clonados os genes homólogos de outras espécies.

Os genes FRO exibem diferentes níveis de expressão, dependendo do órgão da planta e da localização dentro das células. Na célula, os genes FRO são principalmente localizados no vacúolo, embora os principais organelos responsáveis pela homeostase de Fe sejam os cloroplastos e as mitocôndrias. Em *Arabidopsis*, foram identificados oito membros da família FRO que desempenham diferentes papéis na aquisição e transporte de Fe pela planta (**Tabela 1.1**). Por exemplo, FRO2, FRO3 e FRO5 são expressos principalmente nas raízes, enquanto FRO6, FRO7 e FRO8 são maioritariamente expressos na parte aérea. Os genes FRO1 e FRO4 encontram-se tanto nas raízes como nas folhas, no entanto com uma expressão relativamente baixa (Hindt e Guerinot, 2012; Ivanov *et al.*, 2012; Jain *et al.*, 2014). Foi demonstrado que os genes FRO2 e FRO3 são os mais relevantes e a sua expressão aumenta (*upregulation*) em condições de deficiência de Fe (Mukherjee *et al.*, 2006; Robinson *et al.*, 1999).

Tabela 1.1. Localização na planta e a nível celular, e ativação da expressão do gene FRO quando em condições deficientes, em *Arabidopsis*. VS - via secretória; MP - membrana plasmática. Adaptado de Jeong e Connolly (2009).

Gene	Localização na planta	Localização celular	Ativação da expressão quando em deficiência de Fe
FRO1	Caule; siliqua	VS	Baixa expressão
FRO2	Epiderme de raiz; flores (filamentos de antera)	MP	<i>Upregulation</i>
FRO3	Raízes laterais e ápices radiculares; sistema vascular; folhas	Mitocôndria	<i>Upregulation</i>
FRO4	Raiz, parte aérea	VS	Baixa expressão
FRO5	Elevada expressão radicular; parte aérea	MP	Não regulada pelo Fe
FRO6	Parte aérea; flores, siliqua; folhas basais	MP	Não regulada pelo Fe
FRO7	Parte aérea; flores, siliqua	Cloroplasto	Não regulada pelo Fe
FRO8	Sistema vascular nas raízes e na parte aérea. Flores, siliqua	Mitocôndria	Não regulada pelo Fe

Na soja, a expressão do FRO2 é limitada às camadas externas da membrana radicular. Em caso de deficiência de Fe, observa-se um incremento na expressão do FRO2 resultando no aumento da atividade radicular da QFR que proporciona alguma tolerância no crescimento das plantas às condições limitantes (Vasconcelos *et al.*, 2006).

A expressão específica do gene FRO1 no tomate foi descrita em todos os órgãos, mas o gene só é significativamente induzido pela deficiência de Fe nas raízes (Li *et al.*, 2004). A expressão do FRO1 foi observada em raízes e folhas de plantas de ervilha e também foi significativamente induzida em condições de deficiência de Fe (Waters *et al.*, 2002). Nas raízes de pepino, o gene FRO1 foi somente expresso devido à deficiência de Fe (Waters *et al.*, 2007). Estes estudos contribuíram para definir o papel do gene FRO na distribuição do Fe nas plantas além do seu papel na redução do Fe a nível radicular.

2.1.4. O transporte do Fe para as células radiculares

Após a redução do Fe, a fase seguinte é o transporte para o simplasma radicular sendo o gene FRO que assegura o Fe²⁺ substrato para os transportadores. O IRT (*Iron Regulated Transporter*) é uma proteína que regula o transporte do Fe, está localizada na membrana plasmática da raiz e é necessária para assegurar o transporte do Fe reduzido para o simplasto das células do córtex radicular. O IRT foi pela primeira vez identificado em células de levedura, mas tendo vindo a ser encontrado em diversas espécies vegetais (Eide *et al.*, 1996). O IRT pertence à família ZIP (ZIP - resulta das primeiras proteínas transportadoras de Fe e de Zn identificadas em *Arabidopsis*: IRT1 (*Iron Regulated Transporter*); ZRT1 e ZRT2 (*Zinc Regulated Transporter*) que corresponde ao conjunto de transportadores de metais que são conhecidos por terem alta afinidade para o Fe. As proteínas ZIP também podem transportar outros catiões, como o cádmio (Cd), o manganês (Mn) e o zinco (Zn) (Kobayashi e Nishizawa, 2012; Vert *et al.*, 2002; Walker e Connolly, 2008).

2.2. A estratégia II

A estratégia de complexação que ocorre nas gramíneas (estratégia II) baseia-se na excreção de compostos de fitosideróforos (FS) para a rizosfera. Os FS são compostos de baixo peso molecular com alta afinidade para o Fe e para outros metais. Os FS pertencem à família do ácido muginéico (MA) e são sintetizados através da via S-adenosil-L-metionina (Bashir *et al.*, 2006), especialmente sob condições de *stress*, estabelecendo ligações com o Fe oxidado, forma que prevalece em condições de aerobiose existente nos solos aráveis. No arroz, a libertação dos FS para a rizosfera é mediada por vários transportadores de ácido muginéico (TOM), cuja ação é regulada pela disponibilidade de Fe (Nozoye *et al.*, 2015; Nozoye *et al.*, 2011). A formação destes complexos Fe³⁺-FS aumenta o movimento de Fe na solução do solo (Ueno *et al.*, 2007). Diversos estudos têm mostrado que dependendo do tipo e das quantidades de FS presentes em exsudados radiculares as plantas pertencentes a esta estratégia parecem ser mais tolerantes à deficiência de Fe. A proteína YS1 (*Yellow Stripe1*) está localizada na membrana plasmática e é o transportador do influxo dos complexos Fe³⁺-FS para as

células da raiz em diversas espécies, nomeadamente no milho (Curie *et al.*, 2001), arroz (Inoue *et al.*, 2009) e cevada (Araki *et al.*, 2011; Hindt e Guerinot, 2012; Walker e Connolly, 2008). A YS1 também pode transportar outros metais ligados ao FS, como o Zn, o cobre (Cu) e o níquel (Ni). No arroz o fator de transcrição que regula a resposta à deficiência de Fe é denominado *Fe deficiency-responsive elements* (IDEF1) que se observou ter um aumento de expressão génica em condições de deficiência de Fe (Abadía *et al.*, 2011; Kobayashi *et al.*, 2010; Kobayashi *et al.*, 2007).

2.3. A hipótese da estratégia combinada

Atualmente tem sido questionado se as plantas podem ser enquadradas em apenas estas duas estratégias de resposta à deficiência de Fe. Por exemplo, nas plantas de arroz tem sido verificado que parecem combinar partes de ambas as estratégias.

As plantas de arroz expressam vários transportadores de Fe²⁺, incluindo IRT (*Iron Regulated Transporter*) e NRAMP (*Natural Resistance-Associated Macrophage Protein*) na membrana plasmática, mas, por outro lado, a atividade da enzima QFR na raiz é quase insignificante. Considera-se que o IRT1 é o principal transportador envolvido na absorção de Fe²⁺ e o seu nível de transcrição é significativamente induzido em condições de deficiência de Fe associada a uma baixa disponibilidade de oxigénio (Ishimaru *et al.*, 2006; Kobayashi e Nishizawa, 2012; Ricachenevsky e Sperotto, 2014). Da mesma forma, em condições de baixa disponibilidade de oxigénio, a cevada também tem capacidade de absorver o Fe nos dois estados de oxidação-redução e foi identificada a presença de um gene homólogo funcional do IRT1 (Pedas *et al.*, 2008).

Inicialmente, pensou-se que a extrusão de uma grande quantidade de metabolitos (compostos fenólicos, ácidos orgânicos e flavonoides) pelas plantas da estratégia I tinha por objetivo solubilizar Fe³⁺, mas atualmente já se percebeu que também é um passo no mecanismo de absorção de Fe (Jin *et al.*, 2007).

3. Transporte do Fe a longa distância: da raiz à parte aérea

Depois de chegar ao sistema radicular, o Fe deve ser transportado para os tecidos da

parte aérea. Nesta fase é necessário existir um mecanismo que regule o transporte deste elemento na quantidade necessária ao correto funcionamento do metabolismo celular. Os principais passos necessários neste processo são o transporte, a complexação e o armazenamento do Fe.

O Fe entra no simplasto radicular complexado devido à sua fitotoxicidade, à baixa solubilidade e de modo a evitar danos através de reações de redox. No citosol, o pH é neutro, pelo que o Fe deverá estar maioritariamente quelatado com a nicotianamina (Fe^{2+} -NA) que é um aminoácido não proteico, precursor do ácido muginéico que também possui a capacidade de complexar outros iões divalentes tais como Zn^{2+} , Mn^{2+} e Cu^{2+} (Nishiyama *et al.*, 2012; Rellán-Álvarez *et al.*, 2008). O Fe complexado é então transportado através do córtex, via plasmodesmos, até atingir as células do periciclo. O Fe também pode entrar nos tecidos vasculares via apoplasto, pelas paredes celulares da epiderme até atingir a endoderme, onde é forçado a viajar no simplasto para atravessar a faixa caspariana. Em plantas com deficiência de Fe foi demonstrado que existe uma alteração na morfologia da endoderme devido à menor suberização da tira caspariana tornando-a mais permeável e, portanto, permitindo que mais Fe passe até o xilema (Barberon, 2017).

3.1. O carregamento e descarregamento do xilema

Depois do Fe atravessar a endoderme é carregado no xilema para o transporte para a parte aérea. No periciclo o Fe^{2+} é exportado do simplasto para o apoplasto possivelmente através de transportadores, como o YSL (*yellow stripe 1-like transporter*) ou carregado por uma ferroportina até finalmente entrar nos vasos condutores (Abadía *et al.*, 2011; Connorton *et al.*, 2017). O xilema tem um pH ácido e o Fe tem de ser oxidado para formar o complexo tri-Fe(III)-tri-citrato, podendo depois ser transportado a longa distância para a parte aérea através do fluxo de transpiração (Rellán-Álvarez *et al.*, 2010).

Uma das etapas menos estudadas no movimento do Fe na planta está relacionada com a descarga do xilema e a posterior distribuição do Fe nas células foliares. Nos rebentos, o Fe^{3+} é reduzido por membros da família FRO (Jeong e Connolly, 2009) e as proteínas

ZIP foram identificadas no cilindro vascular como possíveis mediadores do transporte do Fe. Nas células do mesófilo o YSL foi identificado no transporte dos complexos Fe com a NA (Curie *et al.*, 2008).

3.2. O transporte do Fe no floema

A distribuição do Fe pelas sementes e pelos tecidos fotossinteticamente ativos como as folhas jovens ocorre pelo carregamento no floema que também é recirculado para as raízes. Os principais transportadores identificados neste processo pertencem à família OPT (*Oligopeptide Transporters*) e YSL. No floema o Fe encontra-se principalmente complexado com a NA devido ao pH neutro a básico, sendo os transportadores YSL os responsáveis pelo transporte deste complexo para o floema. A proteína OPT é um transportador dos metais de transição e regula a absorção do Fe²⁺, contribuindo para a reciclagem de Fe do xilema e atuando como uma ligação funcional entre o xilema e o floema (Zhai *et al.*, 2014).

3.3. O Fe nas folhas

Além das sementes, as folhas são os tecidos mais importantes para o Fe pois é onde ocorre a fotossíntese. Como anteriormente descrito, o Fe é transportado para as folhas como citrato férrico e é mais provável que seja reduzido enzimaticamente por membros da família FRO e é encontrado novamente como Fe²⁺-NA (Gayomba *et al.*, 2015). A maior parte do Fe é utilizada nos cloroplastos e na mitocôndria. Em *Arabidopsis* a FRO7 está localizada na membrana sugerindo que a redução do Fe seja necessária antes de ser importado (Jeong *et al.*, 2008). O Fe é transportado para os plastídios através do transportador PIC (*Permease in Chloroplasts*) e é proposto que possa ser importado complexado com uma proteína. O transportador MIT (*Mitochondrial Iron Transporter*) foi identificado em arroz como transportador do Fe para a mitocôndria (Bashir *et al.*, 2011).

4. Movimento e sinalização do Fe

As atividades para impulsionar a absorção do Fe em condições de deficiência em plantas de estratégia I são controladas por vários fatores de transcrição. O primeiro fator de transcrição envolvido na regulação da deficiência de Fe foi identificado no tomateiro e chamado de FER (Ling *et al.*, 2002). O FER codifica um fator de transcrição de proteína hélice-*loop*-hélice (bHLH) que é expresso em raízes e é controlado pelo nível de Fe. Os transcritos mais altos foram detetados em níveis baixos de Fe, enquanto em níveis elevados de Fe os transcritos foram baixos. Um estudo realizado por Brumbarova *et al.* (2008) revelou que a *downregulation* (diminuição da expressão) do FER é um sinal originado nos tecidos fotossinteticamente ativos, especialmente nas folhas privadas de Fe. O estudo realizado com o mutante *fer* (plantas que não possuem a proteína FER funcional) em plantas de tomateiro revelou a incapacidade de induzir a resposta da estratégia I quando este cresce em condições de deficiência de Fe (Ling *et al.*, 2002).

Em *Arabidopsis*, os genes *AHA2*, *FRO2* e *IRT1* envolvidos no metabolismo do Fe são regulados ao nível da transcrição pela proteína hélice-*loop*-hélice (bHLH) que atua como agente ligante e forma heterodímeros com fatores transcricionais como o FIT (*Fer-Like Iron Deficiency Induced Transcription Factor*) (Brumbarova *et al.*, 2015; Ivanov *et al.*, 2012; Long *et al.*, 2010; Santi e Schmidt, 2009). O fator de transcrição FIT é um componente essencial da via de sinalização da deficiência de Fe que heterodimeriza quer com BHLH38 ou BHLH39 para induzir a transcrição do *FRO2* e do *IRT1* nas camadas externas das raízes e concomitantemente ativando o mecanismo da estratégia I (Yuan *et al.*, 2008).

Um estudo realizado em *Arabidopsis* demonstrou que o mutante *fit* é extremamente clorótico e o conteúdo total de Fe é reduzido. Estas plantas são incapazes de ativar o mecanismo da estratégia I pois a atividade QFR não é induzida e a proteína *IRT1* não é detetável. Estes resultados provaram o papel do FIT na indução do mecanismo de resposta da estratégia I em mais de um aspeto. O FIT é apenas expresso em raízes e regula os genes de absorção de Fe sob condições de deficiência de Fe (Colangelo e Guerinot, 2004). Outro fator de transcrição de BHLH importante na regulação do Fe identificado nesta rede é chamado POPEYE (PYE). PYE foi identificado em raízes de

Arabidopsis e é uma rede independente do FIT que demonstrou regular negativamente a expressão de genes alvos de deficiência de Fe incluindo a nicotianamina sintetase (NAS4) e o gene FRO3 (Long *et al.*, 2010).

No que diz respeito às vias de sinalização da deficiência de Fe, o óxido nítrico e algumas fitohormonas vegetais, como auxinas e etileno, têm sido descritas por diversos autores (Chen *et al.*, 2010; Graziano e Lamattina, 2007) como reguladores que estimulam positivamente a absorção de Fe em condições de deficiência. Em condições limitadas de Fe, a perturbação destas redes reguladoras leva à clorose e ao crescimento limitado. Deste modo, destaca-se a importância das substâncias sinalizadoras no metabolismo do Fe nas diferentes fases e o seu papel na regulação da homeostase de Fe.

5. Sintomas da deficiência de Fe

A falta da correta distribuição do Fe nas plantas resulta no aparecimento dos sintomas de deficiência de Fe que incluem a diminuição da produção de biomassa associada a uma produtividade reduzida e uma menor qualidade das partes edíveis (Pestana *et al.*, 2003; Rombolà *et al.*, 2003).

Embora a clorofila não contenha Fe, a biossíntese da clorofila depende da disponibilidade desse elemento, pois o Fe é um cofator das enzimas que participam na síntese do ácido aminolevulínico (ALA) e da protoclorofila (Miller *et al.*, 1995). A privação de Fe em tecidos vegetais leva a uma diminuição significativa no teor de clorofila nas folhas (Álvarez-Fernández *et al.*, 2006). A cor amarela característica da clorose que ocorre nas folhas jovens (**Figura 1.2**) é resultado de um enriquecimento relativo em carotenoides (Morales *et al.*, 1990).

Fragaria ananassa Duch.



Nicotiana benthamiana Domin.



Lycopersicon esculentum Mill.



Poncirus trifoliata (L.) Raf.



Figura 1.2. Da esquerda para a direita: agravamento dos sintomas de clorose férrica em folhas jovens de *Fragaria ananassa* Duch., *Nicotiana benthamiana* Domin., *Lycopersicon esculentum* Mill. e *Poncirus trifoliata* (L.) Raf..

Os sintomas associados à deficiência de Fe também são visíveis a nível radicular. As plantas podem alterar a arquitetura do sistema radicular como uma resposta ao *stress* para tentar aumentar a absorção deste elemento (**Figura 1.3**).



Figura 1.3. Alteração da morfologia radicular em plantas que cresceram em solução nutritiva com Fe (esquerda) e sem Fe (direita) em diferentes espécies: *Fragaria ananassa* Duch., *Nicotiana benthamiana* Domin., *Lycopersicum esculentum* Mill. e *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.

A modificação da estrutura radicular inclui o aumento do número de raízes secundárias associadas à formação de pelos radiculares e ao aumento de volume dos ápices radiculares, possibilitando a exploração de uma maior área na rizosfera na procura de Fe (Pestana *et al.*, 2012a). O alongamento da raiz lateral depende do transportador de entrada de auxina (*Auxin transporter protein*, AUX1) que acumula a auxina nos ápices radiculares recém-formados (Giehl *et al.*, 2012). Num estudo conduzido em *Arabidopsis*, o mutante *aha7* (mutação no gene H⁺-ATPases) emitiu muito menos pelos radiculares sugerindo a contribuição de AHA7 na diferenciação de células rizodérmicas (Santi e Schmidt, 2009).

6. A partição dos nutrientes na deficiência de Fe

A deficiência de Fe afeta o equilíbrio de nutrientes nos diferentes órgãos das plantas, especialmente nas folhas. Morales *et al.* (1998) descreveram pela primeira vez o paradoxo da clorose de Fe que ocorre em plantas desenvolvidas em condições de campo, especificamente em solos calcários, em que apesar de exibirem sintomas de deficiência de Fe apresentam uma concentração de Fe foliar idêntica à de folhas verdes. Deste modo, destaca-se a imobilização do Fe que ocorre em solos calcários, pois apesar de apresentarem teores foliares de Fe dentro dos limites normais manifestam sintomas, realçando a acumulação de Fe em formas inativas na folha. No entanto, o mesmo não se observou quando os ensaios foram realizados em solução nutritiva onde a clorose foi devida à ausência de Fe.

A dinâmica da partição de nutrientes em condições de deficiência de Fe tem sido referida em várias culturas não se tendo, no entanto, registado um padrão comum. Por exemplo, observou-se um decréscimo generalizado dos teores de macro e micronutrientes na parte aérea em porta-enxertos de citrinos com clorose férrica (Pestana *et al.*, 2005). No arroz, as alterações registadas na partição de nutrientes em resposta à deficiência de Fe dependem do órgão: os macronutrientes (Ca, Mg e K) acumularam-se nas folhas, enquanto os micronutrientes (Zn, Mn e Cu) se acumularam nas raízes; ademais, a deficiência de Fe levou a diminuições de Ca, Mn e Fe nas raízes e de Zn e Ni nas folhas (Sperotto *et al.*, 2012). Noutro estudo registaram-se aumentos de N e P e uma diminuição na concentração de Fe nas folhas cloróticas em plantas de kiwi

(Rombolà et al., 2003). Por outro lado, comparativamente com folhas verdes, (Belkhodja et al., 1998) observou-se em pessegueiro um aumento significativo de K e um ligeiro incremento de N, Mg e Mn nas folhas cloróticas. Quanto ao Ca, foi observado um decréscimo. No mesmo ensaio foi demonstrado que também ocorre uma alteração na partição de nutrientes em flores cloróticas, tendo sido indicado o padrão contrastante do aumento de K e da diminuição do Fe.

Os índices de nutrientes sofrem alterações nas folhas em caso de deficiência de Fe e alguns foram propostos como método de diagnóstico desta deficiência. Tais índices como o P/Fe e o K/Ca geralmente aumentam com a deficiência de Fe e diminuem após a recuperação. Nas folhas de pessegueiro, observou-se um aumento na razão P/Fe e um aumento notável na razão K/Ca sugerindo que esta última possa ser um instrumento mais adequado à avaliação da deficiência de Fe (Belkhodja et al., 1998).

No que se refere à recuperação da clorose de Fe, um ensaio realizado por aplicação foliar local de um fertilizante de Fe resultou num aumento da concentração foliar de Fe com a conseqüente alteração do padrão da composição mineral. Nas folhas recuperadas (verdes), a concentração de Ca e de Mg aumentou comparativamente com as folhas cloróticas, enquanto a concentração de K, N e P diminuiu. No que diz respeito à concentração de micronutrientes, verificou-se uma diminuição nos teores de Zn e de Cu após o reverdecimento dos sintomas, enquanto não foi observado qualquer efeito no teor de Mn (Fernández et al., 2008).

Ensaio realizados em solução nutritiva demonstraram que a deficiência de Fe estimula a absorção de Cu em diversas culturas, nomeadamente milho (Mozafar, 1997), 1997), couves (Xiong et al., 2002) e em morangueiro (Pestana et al., 2013).

7. Os ácidos orgânicos e a deficiência de Fe

Conforme mencionado, os mecanismos de resposta desenvolvidos pelas plantas à clorose férrica envolvem alterações metabólicas que ocorrem em diferentes órgãos da planta.

Os ácidos orgânicos são caracterizados por possuir um ou mais grupos carboxilo (-COOH) na estrutura química e são produzidos principalmente nas mitocôndrias através do ciclo

do ácido tricarbóxico (TCA, ou ciclo de Krebs) e, em menor grau, no glicosoma como parte do ciclo do glioxilato. Devido à natureza catalítica do ciclo de Krebs, os ácidos orgânicos estão presentes apenas em reservas muito pequenas nas mitocôndrias e são preferencialmente armazenados no vacúolo. É improvável que as concentrações dos compostos intermediários do ciclo de Krebs nas mitocôndrias das plantas sejam muito diferentes daquelas observadas em outros organismos vivos. No entanto, é frequente observar que determinados ácidos orgânicos, de acordo com sua participação em funções fisiológicas específicas, se acumulem nos tecidos das plantas ou sejam excretados pelas raízes em resposta à deficiência de Fe.

Em situação de baixa disponibilidade de Fe, diversos estudos registam um aumento na atividade radicular e foliar da fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPC) (Andaluz *et al.*, 2002; Brumbarova *et al.*, 2008; López-Millán *et al.*, 2001), enzima envolvida na via glicolítica e no TCA. Esta alteração na atividade da PEPC está associada a um aumento na fixação de C, e subsequentemente acumulação de ácidos orgânicos (López-Millán *et al.*, 2000).

Na **Tabela 1.2** estão indicados alguns ácidos orgânicos exsudados pelas raízes de diversas espécies condições de deficiência de Fe com destaque nas que se integram na estratégia I.

Tabela 1.2. Ácidos orgânicos que aumentaram a concentração nos exsudados de raízes de diferentes culturas em deficiência de Fe.

Espécies	Ácidos orgânicos	Referência
<i>Pisum sativum</i> L.	Cítrico, málico	(Jelali <i>et al.</i> , 2010)
<i>Glycine max</i> L. Merrill	Cítrico	(Zocchi <i>et al.</i> , 2007)
<i>Cicer arietinum</i> L.	Cítrico, fumárico, malónico, tartárico	(Ohwaki e Sugahara, 1997)
<i>Hordeum vulgare</i> L.	Acético, fumárico, láctico, málico, sucínico	(Fan <i>et al.</i> , 1997)
<i>Cucumis sativus</i> L.	Cítrico, fumárico, láctico, málico, oxálico, sucínico, acético	(El-Baz <i>et al.</i> , 2004; Pii <i>et al.</i> , 2015)
<i>Citrus sinensis</i> Osb. x <i>Poncirus trifoliata</i> Raf.	Cítrico, málico	(Martínez-Cuenca <i>et al.</i> , 2013)
<i>Zea mays</i> L.	Cítrico	(Carvalhais <i>et al.</i> , 2011)
<i>Fragaria</i> x <i>ananassa</i> Duch.	Cítrico	(Valentinuzzi <i>et al.</i> , 2015)

Os ácidos orgânicos desempenham um papel importante não só na biodisponibilidade do Fe na rizosfera como também na translocação do Fe nas plantas da estratégia I (Abadía *et al.*, 2002; López-Millán *et al.*, 2001). O ácido cítrico transporta Fe³⁺ no xilema e geralmente apresenta concentrações superiores no xilema e nas raízes das plantas cloróticas. Os aumentos na concentração de ácido cítrico, bem como de ácido málico, têm sido relacionados com a absorção de Fe em vários órgãos de plantas. A acumulação de ácido cítrico nos órgãos das plantas como resposta à deficiência de Fe parece ser um fator importante, pois esta é uma resposta comum a diferentes espécies (Gayomba *et al.*, 2015; López-Millán *et al.*, 2001; Rellán-Álvarez *et al.*, 2011; Rellán-Álvarez *et al.*, 2010; Zocchi *et al.*, 2007).

8. Silenciamento génico induzido por vírus

O silenciamento génico induzido por vírus (VIGS; *Virus Induced Gene Silencing*) é uma técnica que oferece várias vantagens no estudo da tolerância aos *stresses* abióticos nas plantas. Este método explora um dos mecanismos de defesa natural que as plantas usam contra-ataques virais e resulta na degradação dos mRNA (RNA mensageiro) virais. Se um gene hospedeiro for clonado e inserido no genoma viral, então os mRNA derivados da cópia da planta do gene também serão degradados através do mecanismo de silenciamento chamado silenciamento génico pós-transcricional (*Post-Transcriptional Gene Silencing*, PTGS) e permitindo estudar o efeito da sua inativação no fenótipo da planta (Agüero *et al.*, 2014; Senthil-Kumar e Mysore, 2011).

A técnica engloba três fases de desenvolvimento, em primeiro lugar, o estabelecimento de interações compatíveis com a planta e o vírus, gerando genomas virais que contêm um fragmento do gene de interesse (GDI) com objetivo de ser silenciado. Em segundo lugar, a transformação do genoma viral modificado via *Agrobacterium tumefaciens* e inoculação em plantas. Em terceiro lugar, quando o RNA viral é transcrito e replicado, produz-se um RNA de cadeia dupla que desencadeia o mecanismo PTGS da planta, levando ao silenciamento de ambas, e de sequências complementares, que são então degradadas (Becker e Lange, 2010; Burch-Smith *et al.*, 2004; Lange *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2002; Senthil-Kumar e Mysore, 2011).

Existem vários vetores virais desenvolvidos para a técnica VIGS e o vírus do TRV (*Tobacco Rattle Virus*) é um dos mais utilizados (Liu *et al.*, 2002; Valentine *et al.*, 2004). O TRV possui um sistema bipartido de genoma RNA de cadeia positiva. O RNA1 contém os genes necessários para a replicação viral e o movimento, e o RNA2 codifica as proteínas necessárias para a formação do virião. A sequência parcial do gene de interesse pode ser clonada num sítio de clonagem múltipla do RNA2 que substitui proteínas virais não necessárias para VIGS (Sahu *et al.*, 2012; Senthil-Kumar e Mysore, 2011, 2014).

O VIGS foi utilizado com sucesso em várias culturas para validação de genes funcionais envolvidos no desenvolvimento de plantas, como pimenteiro (Tian *et al.*, 2014), pimenta chili (Arce-Rodríguez e Ochoa-Alejo, 2015), tomateiro (Fu *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2002; Orzaez *et al.*, 2006), batateira (Brigneti *et al.*, 2004), citrinos (Agüero *et al.*, 2014) e morangueiro (Chai *et al.*, 2011). Esta técnica também provou ser utilizada para o estudo de genes relacionados à tolerância ao *stress* hídrico (Choi e Hwang, 2012; Li *et al.*, 2013; Senthil-Kumar *et al.*, 2008), resistência a doenças (Kandoth *et al.*, 2013), resistência a insetos (Bhattarai *et al.*, 2007) e *stress* nutritivo (Atwood *et al.*, 2014; He *et al.*, 2008; Xia *et al.*, 2012).

A *Nicotiana benthamiana* tem sido amplamente utilizada como planta modelo para ensaios VIGS devido a uma alta suscetibilidade a um grande número de vírus de plantas e rápido manifestação do fenótipo privado. Outro aspeto importante é que o marcador de sequência expressa (*Expressed Sequence Tags*, EST) que são sequências de DNA derivadas através de reações de sequenciação e usadas para identificar genes expressos, desta espécie é frequentemente homólogo a outras espécies como tomate, batata e pimento (Goodin *et al.*, 2008; Senthil-Kumar e Mysore, 2011).

9. Objetivos globais

O Fe é um micronutriente essencial para as plantas superiores. A clorose do férrica é uma consequência de fatores que restringem a disponibilidade, absorção ou uso do Fe pelas plantas na medida em que quando ocorre é suscetível de limitar severamente as produções agrícolas e conseqüentemente a qualidade dos produtos agrícolas para consumo humano.

O objetivo principal deste trabalho foi o de analisar mecanismos de resposta ao movimento e sinalização do Fe em plantas que ativam a estratégia reductora (estratégia I) quando a biodisponibilidade deste elemento é limitada.

Para atingir esse objetivo foram realizadas as seguintes linhas de experiências:

1. No primeiro ensaio que abrange o artigo "A memória do *stress*: deficiência de ferro em morangueiro " (Capítulo 3) o objetivo principal foi o de caracterizar e compreender os fluxos e partição do Fe em plantas de morangueiro sob condições deficientes de Fe e as adaptações após a recuperação desta deficiência. Foi analisada a distribuição de nutrientes e de compostos orgânicos que atuam como transportadores do Fe em diferentes órgãos da planta.
2. Na segunda seção integram-se dois ensaios envolvendo o silenciamento do gene FRO1 que codifica a enzima da QFR (Capítulo 4). O primeiro ensaio foi realizado em *Nicotiana benthamiana* e abrange o artigo "Silenciamento do gene FRO1 e seus efeitos na partição do Fe em *Nicotiana Benthamiana*" e o segundo ensaio foi realizado em *Lycopersicon esculentum*. Para a realização destes ensaios, utilizou-se a técnica VIGS para silenciar o gene FRO1 o que permitiu estudar o efeito de plantas supostamente incapazes de sintetizar a enzima QFR, alterando os processos metabólicos como a síntese de clorofila e a partição do Fe nos diferentes órgãos. Foi possível ainda verificar como o recurso ao VIGS permitiu estudar a expressão do gene FRO1 em plantas silenciadas e não silenciadas que cresceram com diferentes níveis de Fe na solução nutritiva.
3. A terceira seção abrange o artigo "A indução de deficiência de ferro no porta-enxerto *Poncirus trifoliata* e o desempenho fisiológico após o transplante para o

solo" (Capítulo 5). Neste trabalho pretendeu-se estudar os mecanismos de resposta ao Fe comparando plantas cultivadas com distintos níveis de Fe e o comportamento posterior destas plantas quando transplantadas para dois solos diferentes: calcário e não calcário. Deste modo, foi possível estabelecer novos conhecimentos sobre a eficácia dos *pools* internos de Fe e o impacto da adaptação fisiológica e morfológica em resposta a um novo ambiente.

CAPÍTULO 2

MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Enquadramento

As experiências descritas nesta tese foram realizadas nos laboratórios de nutrição vegetal e virologia da Faculdade de Ciências e Tecnologia (FCT) da Universidade do Algarve, Portugal. Os ensaios decorreram em hidroponia e/ou em vaso e foram realizados em estufa ou ao ar livre com rede de sombreamento sob condições de fotoperíodo natural. O Algarve caracteriza-se por um clima típico do Mediterrâneo, com verões secos e quentes e invernos suaves. A temperatura média do ar varia entre 12 °C em janeiro e 24,2 °C em julho e a precipitação média varia entre 114,1 mm em dezembro e 1,8 mm em julho. Um dos ensaios foi efetuado em câmara de crescimento sob 16h/8h ciclo luz/escuro com temperatura controlada a 25°C.

Esta tese é composta por quatro ensaios principais organizados em três capítulos encontrando-se parte dos resultados publicados:

- **Capítulo 3** - A memória do *stress*: deficiência de ferro em morangueiro.
- **Capítulo 4** - Silenciamento do gene FRO1
- **Capítulo 5** - A indução de deficiência de ferro no porta-enxerto *Poncirus trifoliata* e o desempenho fisiológico após o transplante para o solo.

O capítulo de Material e Métodos descreve os procedimentos analíticos gerais utilizados nos diferentes ensaios.

2.2. Material vegetal

Neste trabalho usaram-se diferentes espécies vegetais designadamente, o morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duch. cultivar (cv.) 'Diamante'), a *Nicotiana Benthamiana* Domin., o tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv. 'Cherry') e um porta-enxerto de citrinos (*Poncirus trifoliata* (L.) Raf.). O material vegetal é determinante na tolerância ou não das culturas à deficiência de Fe induzida quando instalados em solos calcários. Como foi descrito no capítulo 1, as plantas eficientes desenvolvem mecanismos específicos de

resposta. Para a realização desta investigação e experimentação utilizaram-se plantas enquadradas na estratégia I de mecanismo de resposta à deficiência de Fe.

As plantas de *Fragaria ananassa* cv. 'Diamante' foram adquiridas de raiz nua, aos Viveiros Riba-Douro (Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real). Nesta fase as plantas foram lavadas e desinfetadas por imersão do sistema radicular numa solução de 2 g L⁻¹ de fosetil de alumínio, onde permanecem durante duas horas. As plantas foram transferidas para caixas de plástico de 20 L de capacidade com solução nutritiva completa de "Hoagland".

As plantas de *Nicotiana Benthamiana* foram obtidas a partir da germinação de sementes colecionadas de plantas existentes no laboratório de virologia. As sementes foram germinadas numa mistura de vermiculite e turfa numa proporção de 1:2. As plantas com quatro semanas de idade foram transferidas para vasos contendo turfa e colocadas numa câmara de crescimento a 25°C com ciclo de luz/escuro de 16h/8h. Após a emissão de 4 a 5 folhas, um conjunto de 8 plantas foram selecionadas para a agroinfiltração. A agroinfiltração via *Agrobacterium tumefaciens* foi a técnica utilizada para a inoculação do vetor VIGS levando ao silenciamento pós-transcricional do gene FRO1. As restantes 7 plantas permaneceram como controlo (sem agroinfiltração). Após um período de adaptação de 15 dias, as plantas foram transferidas para recipientes individuais preenchidos com solução nutritiva Hoagland a meia força.

As plantas de *Lycopersicon esculentum* cv. 'Cherry' foram obtidas a partir da germinação de sementes certificadas adquiridas de Semillas Fitó. As sementes foram germinadas a 25 °C numa câmara de crescimento sob um ciclo de luz/escuro de 16h/8h numa mistura de vermiculite e turfa numa proporção de 1:2. Após a emissão de duas folhas verdadeiras, as plantas foram colocadas a crescer em solução nutritiva Hoagland a meia força numa estufa, sob condições naturais de fotoperíodo e temperatura do ar ≤ 25°C. Durante este período de aclimação, o Fe foi adicionado à solução nutritiva numa concentração baixa (0,5 µM de Fe).

Os porta-enxertos certificados de *Poncirus trifoliata* de um ano de idade foram adquiridos na Associação de Viveiristas de Coimbra. As plantas foram removidas do substrato e as raízes foram completamente lavadas e desinfetadas por imersão numa

solução com 2 g L⁻¹ fosetil de alumínio durante 2 horas. As plantas foram colocadas a crescer em solução nutritiva completa de Hoagland numa estufa, sob condições naturais de fotoperíodo e temperatura do ar ≤ 25°C. O ensaio começou no dia 12 de abril e, nesta fase, as plantas apresentaram as seguintes características (média ± erro padrão): altura 31,3 ± 1,6 cm; número de folhas 20 ± 2; peso seco da parte aérea 2,2 ± 0,1 g; peso seco da raiz 6,5 ± 0,3 g.

2.3. Solução nutritiva

A solução nutritiva de Hoagland foi a utilizada nos ensaios que decorreram em hidroponia (**Figura 2.1**). As soluções foram preparadas com água desmineralizada com as seguintes concentrações de macronutrientes (em mM): 5,0 Ca(NO₃)₂·4H₂O, 5,0 KNO₃, 1,0 KH₂PO₄, 2,0 MgSO₄·7H₂O e de micronutrientes (em μM): 46,0 H₃BO₃, 0,8 ZnSO₄·7H₂O, 0,4 CuSO₄·5H₂O, 9,0 MnCl₂·4H₂O e 0,02 (NH₄)₆Mo₇O₂₇·H₂O. Por vezes, e face à dimensão das plantas, foram utilizadas soluções nutritivas a meia força, sendo as concentrações dos macronutrientes e micronutrientes diluídas a 50%. O Fe foi adicionado às soluções sob a forma de ácido etileno-diamina di-orto-hidroxi-fenil de ferro (Fe-EDDHA). As concentrações de Fe foram estabelecidas em função dos objetivos de cada um dos ensaios (resumidamente apresentados na **Tabela 2.1**) e estão descritas posteriormente nos respetivos capítulos.

Tabela 2.1. Ensaios decorridos em solução nutritiva as respetivas espécies, concentrações de Fe testadas e número total de dias de ensaio.

Espécie	Dias de ensaio	Concentrações de Fe [μM] Fe (Fe-EDDHA)
<i>Fragaria ananassa</i>	47	- (Fe): 0 + (Fe): 10
<i>Nicotiana Benthamiana</i>	49	- (Fe): 0 + (Fe): 2,5
<i>Lycopersicum esculentum</i>	40	- (Fe): 0 + (Fe): 0,5 + (Fe): 10
<i>Poncirus trifoliata</i>	84	- (Fe): 0 + (Fe): 120

As soluções nutritivas foram constantemente arejadas por um compressor ligado a um sistema de tubagens, regulado por torneiras de forma a garantir um fluxo de ar adequado a nível radicular.



Figura 2.1. Aspeto geral dos ensaios em solução nutritiva com morangueiros em caixas de 20L. Morangueiros que cresceram em solução nutritiva sem Fe desenvolveram sintomas de deficiência de Fe; enquanto morangueiros que cresceram em solução nutritiva com Fe permaneceram verdes.

O pH foi ajustado para $6,0 \pm 0,1$ e a condutividade elétrica (CE) registada entre $2,2 \pm 0,1$ dS m^{-1} . A monitorização das soluções nutritivas foi efetuada cada 3 dias, através da utilização de um potenciómetro (HI 9024C, Hanna Instruments) e de um condutímetro (LF95/SET, WTW), ambos equipamentos portáteis. Sempre que necessário o volume de solução nutritiva foi aferido com água desmineralizada. A solução foi completamente renovada sempre que os valores de CE baixavam de $2,0 \text{ dS m}^{-1}$ para a solução completa ou de $1,0 \text{ dS m}^{-1}$ quando em meia força.

2.4. Quantificação da clorofila total

O grau de clorose das folhas foi estimado de modo não destrutivo através da utilização de um aparelho medidor de clorofila SPAD-502 (*Soil Plant Analysis Development*, Minolta Co., Osaka, Japão). O princípio de funcionamento deste aparelho consiste em medir a luz transmitida através de uma folha depois de submetida, sequencialmente, a dois tipos de luz; primeiro com uma radiação na zona do vermelho a 650 nm, que corresponde a um pico de absorção das moléculas das clorofilas *a* e *b* e uma radiação de referência, na zona do infravermelho a 940 nm (Markwell *et al.*, 1995).

Para cada espécie utilizada neste trabalho, estimou-se uma curva de calibração de clorofila onde valores de SPAD foram convertidos em concentração foliar de clorofila total ($\mu\text{mol m}^{-2}$). Para tal, foram recolhidas várias folhas com diferentes graus de clorose (**Figura 2.2**).

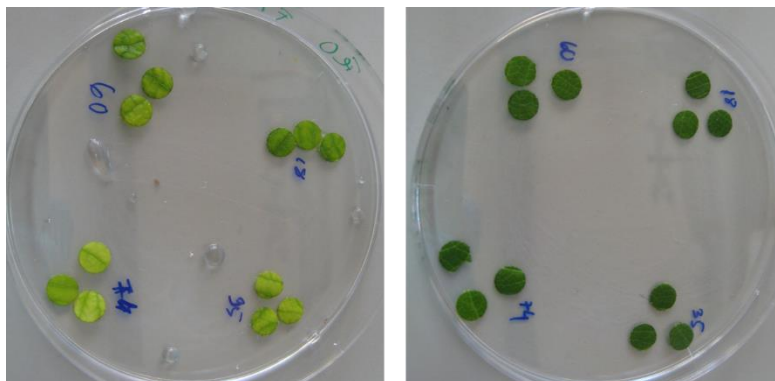


Figura 2.2. Fotografia com exemplificação dos discos foliares de morangueiro com diferentes graus de clorose para a elaboração da curva de calibração de valores de SPAD para clorofila total.

A extração dos pigmentos foi realizada conforme descrito por Abadía e Abadía (1993). Foram recortados discos foliares de 1,0 cm de diâmetro (correspondendo a uma área de $0,7854 \text{ cm}^2$) e foi registado o respetivo valor de SPAD de cada disco. De seguida, cada disco foi individualmente e rapidamente macerado com acetona a 100%, na presença de ascorbato de sódio, de modo a evitar a rápida degradação da clorofila *a*. Do mesmo modo, o processo de maceração foi efetuado num almofariz arrefecido ($4 \text{ }^\circ\text{C}$) e em condições de luz reduzida, de modo a evitar a degradação dos pigmentos. A absorvância das amostras foi determinada por leitura num espectrofotómetro UV-Visível (UV-160 A, Shimadzu Kyoto, Japão) a dois comprimentos de onda: $661,6 \text{ nm}$, correspondente à clorofila *a*, e a $644,8 \text{ nm}$, correspondente à clorofila *b*. A conversão dos valores de absorvância (*A*) em concentração de clorofila (mg L^{-1}) foi estimada de acordo com as equações propostas por Lichtenthaler (1987).

$$\text{Clorofila } a = 11,24 * A_{661,6} - 2,04 * A_{644,8}$$

$$\text{Clorofila } b = 20,13 * A_{644,8} - 4,19 * A_{661,6}$$

$$\text{Clorofila total} = \text{Clorofila } a + \text{Clorofila } b$$

Todos os valores de SPAD foram convertidos em μmol de clorofila total por unidade de área (m^2) e para cada espécie foi ajustada a função usando os procedimentos do modelo de regressão linear (SPSS; **Tabela 2.2** e **Figura 2.3**).

Tabela 2.2. Equações de calibração dos valores de SPAD em clorofila total ($\mu\text{mol m}^{-2}$) para as diferentes espécies utilizadas neste trabalho. r^2 - coeficiente de determinação; P – probabilidade, onde *** indica nível de $P < 0,001$; n - número de observações.

Espécie	Equação de calibração de valores SPAD	r^2	n	P
<i>Fragaria ananassa</i> cv. 'Diamante'	$(0,37 \pm 0,53)*\text{SPAD}^2 + (6,23 \pm 2,62)*\text{SPAD} + (71,56 \pm 28,01)$	0,97	38	***
<i>Nicotiana benthamiana</i>	$(21,56 \pm 0,86)*\text{SPAD} + (10,24 \pm 13,99)$	0,97	23	***
<i>Lycopersicum esculentum</i> cv. 'Cherry'	$(0,16 \pm 0,06)+\text{SPAD}^2 + (18,67 \pm 2,13)*\text{SPAD}$	0,98	34	***
<i>Poncirus trifoliata</i>	$(0,23 \pm 0,05)*\text{SPAD}^2 - (3,05 \pm 4,77)*\text{SPAD} + (104,11 \pm 10,40)$	0,95	37	***

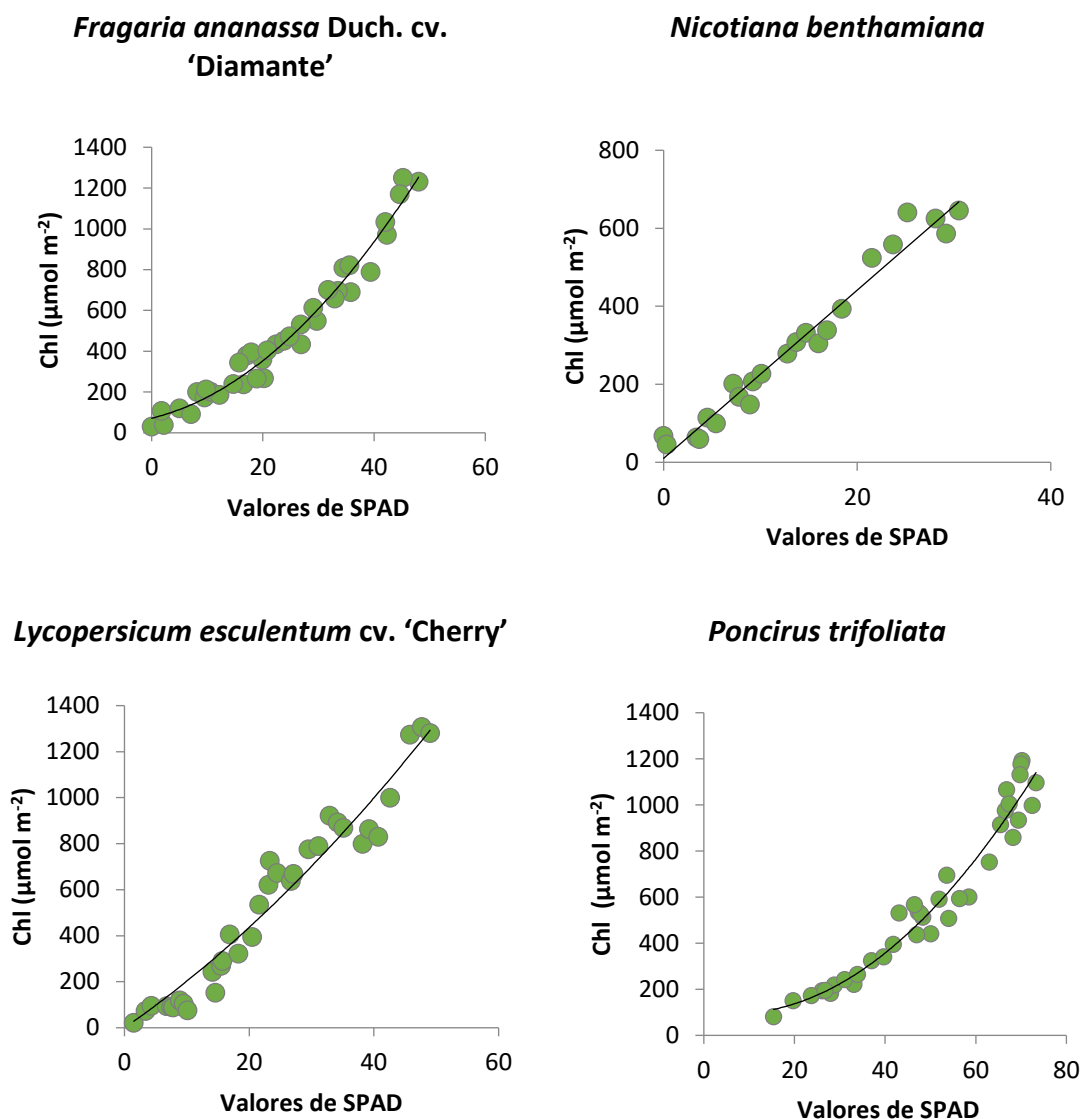


Figura 2.3. Relação entre os valores de SPAD e a concentração foliar de clorofila total ($\mu\text{mol m}^{-2}$) para cada espécie.

2.5. Crescimento vegetativo e avaliação da biomassa

As medições dos parâmetros de crescimento, como a altura e o número de folhas, foram realizadas 1 a 3 vezes por semana nas plantas marcadas por modalidade.

As amostras dos diferentes órgãos vegetais colhidos para análise foram lavadas para remover qualquer contaminação superficial, primeiro com detergente não iônico (0,1

%), depois com 0,01 M de HCl, posteriormente com água corrente e, por último, enxaguado três vezes com água desionizada.

O peso fresco (PF) foi registado para cada amostra e posteriormente as amostras foram colocadas a secar a 60°C até peso constante e nesta fase foi registado o peso seco (PS).

Com os valores do peso seco da parte aérea e da parte radicular determinou-se a razão entre a parte radicular e a aérea (R/A) usando o seguinte cálculo:

$$R/A = \text{PS parte radicular} / \text{PS parte aérea}$$

2.6. Composição mineral

As amostras vegetais depois de secas foram finamente moídas através de um moinho (IKA MF10) de modo a homogeneizar o material vegetal. A composição mineral foi determinada através dos métodos normalizados descritos pela *Association of Official Analytical Chemists* (A.O.A.C., 1990). Pesou-se 1 g de material vegetal e as amostras foram incineradas, de modo a facilitar a solubilização do material vegetal, por via seca numa mufla à temperatura de 500°C durante 8 horas. Em seguida adicionaram-se 4 ml de HNO₃ (1:1) e as amostras colocadas numa placa de aquecimento até evaporação. Posteriormente voltaram a ser colocados na mufla, por mais 4 horas, à mesma temperatura. Finalmente foram solubilizadas com HCl (1 M). A concentração total de N foi determinada através do método Kjeldahl. O P foi determinado através da análise por espectrofotometria de UV-Visível do complexo molibdovanadato fosfórico a 375 nm. As concentrações de K, Ca, Mg, Cu, Mn, Zn e Fe foram determinadas por espectrofotometria de absorção atómica de acordo com os procedimentos A.O.A.C.

A concentração de macronutrientes (N, P, K, Ca e Mg) e micronutrientes (Cu, Zn, Mn e Fe) foi expressa em g kg⁻¹ e em mg kg⁻¹, respetivamente. O teor de macronutrientes e micronutrientes por órgão (expressa em mg órgão⁻¹ e µg órgão⁻¹, respetivamente) foi calculado multiplicando o PS de cada órgão pela concentração do respetivo nutriente. A partição do Fe (%) entre o tipo de folhas (velhas e jovens) foi calculada em relação à quantidade total de Fe foliar.

2.7. Atividade da quelato de Fe(III)-redutase (QFR)

A determinação da atividade da enzima QFR (EC 1.16.1.17) foi calculada em ápices radiculares e/ou em discos foliares de folhas velhas e folhas jovens. Utilizou-se um método modificado a partir do proposto por Bienfait et al. (1983). Este método baseia-se na quantificação colorimétrica do complexo Fe(II)-BPDS (dissulfonato de batofenantrolina) resultante da redução do Fe adicionado na forma de Fe(III)-EDTA (ácido etileno diamino tetra-acético). Na medição da atividade dos ápices radiculares, cortaram-se ápices com 2 cm de comprimento com um bisturi e na atividade da QFR foliar, cortaram-se discos foliares com área de 0,13 cm². As reações ocorreram num tubo *ependorf* de 1,5 mL de capacidade (**Figura 2.4**) contendo a seguinte composição: 900 µL de solução de Hoagland a meia força e sem micronutrientes, 300 µL de BPDS, 30 µL de Fe(III)-EDTA e 300 µL de solução tampão MES (ácido 2-(N- morfolino)etanossulfônico; pH = 6,0). O tempo de reação no escuro foi ajustado aos diferentes órgãos vegetais analisados: 1 h para ápices radiculares e 2 h para discos foliares. Apenas nas determinações efetuadas em ápices radiculares de *Poncirus trifoliata* foi necessário aumentar o tempo de incubação para 2 h. Em paralelo, efetuaram-se sempre soluções de controlo (sem material vegetal) de modo a corrigir possíveis reduções não específicas do Fe. Após este período procedeu-se à leitura da absorvância das amostras a 535nm num espectrofotómetro UV-Visível. Para os cálculos considerou-se um fator de extinção de 22,14 mM cm⁻¹. Os resultados expressaram-se em nmol de Fe(II) min⁻¹ g⁻¹ de peso fresco (PF).

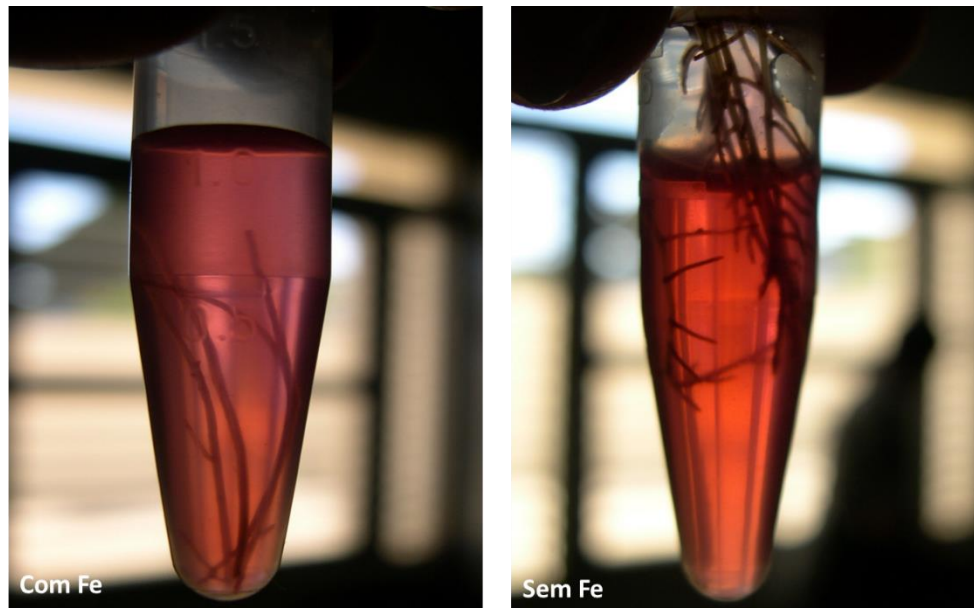


Figura 2.4. Ensaio da atividade da QFR em ápices radiculares de morangueiro que cresceram com e sem Fe na solução nutritiva. O Fe reduzido produz uma coloração rosa quando complexado com o BPDS.

2.8. Quantificação e extração dos ácidos orgânicos

A quantificação de ácidos orgânicos foi feita no ensaio com plantas de morangueiro, tendo sido recolhidos separadamente diferentes órgãos: raízes, folhas velhas e folhas jovens.

Para cada tratamento, pelo menos 20 ápices radiculares (com aproximadamente 2 cm de comprimento, totalizando $100 \text{ mg} \pm 10$ de PF para extração) e dois discos foliares de 1,5 cm de diâmetro (aproximadamente $72 \text{ mg} \pm 2$ para folhas velhas e $59 \text{ mg} \pm 3$ para folhas jovens) foram retirados em três datas ao longo do ensaio (15, 35 e 47 dias após o início do ensaio). Para cada disco foliar o valor de SPAD foi registrado e as amostras foram imediatamente congeladas a -80°C até a extração de ácidos orgânicos. Cada amostra foi moída a pó num almofariz pelo uso de N_2 líquido. De seguida, este pó foi suspenso em H_2SO_4 a 8 mM e colocado a ferver durante 30 minutos (López-Millán *et al.*, 2009). As amostras foram centrifugadas a 2320 g durante 10 min e o sobrenadante foi filtrado através de um filtro de PTFE (politetrafluoretileno) de $0,45 \mu\text{m}$. O volume final foi ajustado a 2 mL e armazenado a -80°C até serem realizadas as análises. Os reagentes padrão de elevada qualidade de ácido cítrico e de ácido succínico foram adquiridos da

Fluka (Epalinges, Switzerland) e o ácido málico foi adquirido à Merck (Hohenbrunn, Germany). Os isótopos marcados, ácido cítrico-2,2,4,4-d₄, ácido succínico-2,2,3,3-d₄ e DL-ácido málico-2,3,3-d₃ foram obtidos da Sigma Aldrich Inc. (St. Louis, MO, USA). Nesta análise foi usada água da qualidade Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA).

A quantificação de ácidos orgânicos foi realizada por LC-MS (*Liquid chromatography - mass spectrometry*) usando a metodologia de diluição isotópica estável (DIE). O sistema de LC-MS utilizada pertence à Agilent Technologies 1200 Series com LC acoplado ao Bruker Daltonics HCT ultra armadilha de iões (ion trap analyser) e a ionização foi feita por electropulverização com polaridade negativa. A separação cromatográfica foi feita por uma coluna SeQuant (Merck) ZIC-pHILIC (150 x 2,1 mm, 5 µm, polímeros expansíveis). Cada amostra foi analisada para ácidos succínico, málico e cítrico, utilizando o respetivo padrão interno para quantificação. A concentração de cada padrão interno, ácido cítrico-2,2,4,4-d₄, ácido succínico-2,2,3,3-d₄ e DL-ácido málico-2,3,3-d₃ foi respetivamente de 100 µM, 50 µM e 50 µM. Os limites de deteção variaram de 4 a 16 pmol para os ácidos succínico e málico e de 100 pmol para o ácido cítrico. A quantificação foi calculada utilizando as áreas de cada pico e os valores finais foram expressos em µmol g⁻¹ de PF.

2.9. Construção do plasmídeo TRV2-FRO1

O vetor recombinante baseado no Tobacco rattle virus (TRV) foi usado para silenciar o gene da FRO1. Para a construção do plasmídeo TRV2-FRO1 foi adquirida uma sequência de DNA sintetizada pela GeneArt® (Thermo Fisher Scientific) totalizado 361 pares de bases (pb), correspondendo 303 pb a parte do gene FRO1 do *Lycopersicon esculentum* (LeFRO1; AY224079.1 - bases 1094-1396), ao qual foram adicionadas sequências de 29 pb correspondendo aos locais de recombinação do attB em cada extremidade. O fragmento foi amplificado no termociclador (Gradient Biometra) recorrendo à técnica *Polymerase chain reaction* (PCR) num volume final de 50 µL de reação contendo 200 µM de cada dNTP, 0,2 µM dos seguintes *primers* attB: 5'-GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CT-3' e 5'-GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GT-3', 1U DNA *Pfu*

polimerase e o respetivo tampão. Os ciclos de temperatura aplicados foram os seguintes: 94°C durante 2 minutos, seguido de 25 ciclos de 92°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos e 72°C durante 30 segundos, com uma incubação final de 72°C durante 5 minutos.

O produto amplificado foi analisado em gel de agarose a 1% em tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE) e corado em brometo de etídio. O fragmento de interesse resultante de PCR foi recortado do gel e purificado recorrendo ao kit de recuperação de DNA Gel Zymoclean™ (Zymo Research Corp.) seguindo a instruções do fabricante. Através da técnica de recombinação por Gateway (Invitrogen) o fragmento foi inserido no vetor pDONR-Zeo contendo os locais de recombinação attP1 e attP2 usando a enzima BP Clonase. Usou-se 2,5 µL da mistura de reação de recombinação BP e foi feita a transformação genética usando as células competentes de *E. coli* One Shot® Mach1™ colocadas a incubar em placas contendo meio *Luria Bertani* (LB) e Zeocin (50 µg mL⁻¹). Após pesquisa e confirmação por PCR de um clone que albergasse o fragmento recombinado, foi colocado a crescer durante a noite em meio LB líquido suplementado com o respetivo antibiótico e a extração plasmídica foi feita com o GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific). O DNA total foi quantificado usando o espectrofotômetro NanoDrop 2000c (Thermo Scientific) a 260 nm. A razão de absorvância a 260 nm e 280 nm foi usada para avaliar a pureza da amostra de DNA (ausência de contaminação proteica), sendo superior a 1,80. A identificação da construção foi confirmada pela sequenciação de DNA. O clone de expressão, TRV2-FRO1, foi gerado através da recombinação LR, mobilizando o clone de entrada contendo os locais de recombinação attL para o vetor TRV-RNA2, conhecido como pYL279 (Liu *et al.*, 2002) contendo sítios de recombinação attR usando a enzima LR Clonase. Esta mistura foi transformada em células competentes de *E. coli* Mach1 em placas LB contendo canamicina (50 µg mL⁻¹). O DNA plasmídico das culturas recombinantes de *E. coli* foi purificado utilizando o GeneJET Plasmid Miniprep Kit. O DNA total foi quantificado e a construção final foi confirmada por PCR. Esta construção será chamada pTRV2-FRO1 no restante deste trabalho.

2.10. Silenciamento génico induzido por vírus (VIGS)

Para o ensaio de VIGS, os plasmídeos pTRV1 e pTRV2-FRO1, foram usados na transformação por electroporação em células quimicamente competentes de *Agrobacterium tumefaciens* estirpe C58C1 que contêm um plasmídeo de apoio à infecção, o pMP90. As células competentes de *A. tumefaciens* foram preparadas pelo método do cloreto de cálcio (Seidman *et al.*, 1997). Plaqueou-se 50 μL das células transformadas em meio LB suplementado com rifampicina e gentamicina (para seleção da estirpe) e canamicina (para seleção do vetor TRV) com uma concentração de 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e ficaram a crescer durante 2 dias a 28°C. Preparou-se o pré-inóculo das culturas de pTRV1 e pTRV2-FRO1 separadamente em 5 mL de meio LB líquido a partir de uma colónia isolada *Agrobacterium tumefaciens* suplementado com os respetivos antibióticos e colocado a crescer a 28 °C com agitação a 200 rpm durante a noite até a cultura ter atingido a densidade ótica registada entre 0,5 e 0,8 por espectrofotómetro a 600 nm (DO_{600}).

Para a agroinfiltração foram colocados 1 mL dos pré-inóculos das culturas de *Agrobacterium tumefaciens* transformadas com pTRV1 e pTRV2-FRO1 e foram colocados a crescer separadamente durante a noite a 28°C, com agitação em 50 mL de meio LB suplementado com 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ dos respetivos antibióticos, 10 mM de MES, 20 μM de acetoseringona até atingir uma DO_{600} entre 0,5 e 0,6. Os inóculos foram centrifugados e ressuspensos em 50 mL de solução contendo MES (10 mM), MgCl_2 (10 mM), acetoseringona (200 μM) e pH ajustado com KOH para 5,6. Nesta fase as duas suspensões foram misturadas numa proporção de 1:1 e ficaram a incubar no escuro à temperatura ambiente durante aproximadamente 3 h. Para a agroinfiltração usou-se uma seringa de 1 mL sem agulha e o inóculo foi aplicado na parte abaxial das folhas (**Figura 2.5**).



Figura 2.5. Ilustração da agroinfiltração do inoculo em folhas de *Lycopersicon esculentum* utilizando uma seringa sem agulha na parte abaxial das folhas.

2.11. Deteção do vetor TRV

A deteção do vetor TRV foi realizada por imunoabsorção enzimática de dupla sanduiche (DAS-ELISA) usando anticorpos comerciais específicos para o TRV (Sediag, INRA, França). Os poços da microplaca foram preenchidos com 100 μ L do anticorpo de revestimento e incubados durante 2 h a 37°C. A suspensão de anticorpo de revestimento foi removida por lavagem com 1X PBS-Tween. Doze dias após a inoculação com o vetor VIGS foram selecionadas plantas e cortada uma folha jovem (que cresceu posterior à agroinfiltração). Os extratos foliares foram preparados por maceração de 1 g de material vegetal fresco em 10 mL de tampão de extração de PVP-PBS 1 %, sendo adicionados 100 μ L de cada amostra aos poços da microplaca e colocada a incubar durante 16 h com 4°C. Novamente a microplaca foi lavada como descrito anteriormente. Em seguida, os poços foram preenchidos com alíquotas de 100 μ L de conjugado específico de anticorpo-fosfatase alcalina e incubados durante 2 h a 37°C e posteriormente efetuou-se a lavagem da placa. O substrato de fosfato de p-nitrofenilo (pNPP) foi dissolvido em tampão de substrato (1X concentrado) e cada poço foi preenchido com alíquotas de 100 μ L. As placas foram mantidas ao escuro à temperatura ambiente durante 60 minutos a 37°C. A adição do substrato da enzima origina uma coloração amarela (**Figura 2.6-A**). Os resultados foram avaliados pela medição da absorvância a 405 nm em leitor de placas

ELISA de microtitulação. Os resultados foram interpretados e as plantas foram consideradas infetadas quando o valor de absorvância excedeu duas vezes os valores médios das respetivas amostras das plantas não inoculadas com o vetor VIGS. As plantas TRV-positivas no teste DAS-ELISA foram selecionadas e utilizadas no ensaio. A construção TRV-GFP (*Green fluorescent protein*, previamente obtida no laboratório) foi inoculada num conjunto de plantas e utilizado como controlo do vetor (Costa, 2014), uma vez que a GFP não possui qualquer homologia de DNA com o genoma da planta e não causará silenciamento. Por esse motivo, neste estudo foi usada para avaliar os resultados que possam ser devidos à infeção por TRV. A deteção de plantas de controlo com expressão da GFP foi observada em plantas inteiras com recurso a uma lâmpada de UV de 100 W (BlackRay B-100AP, UV products, Upland, CA, USA) e fotografadas com uma câmara digital Cannon (Canon EOS 450D, **Figura 2.6-B**).

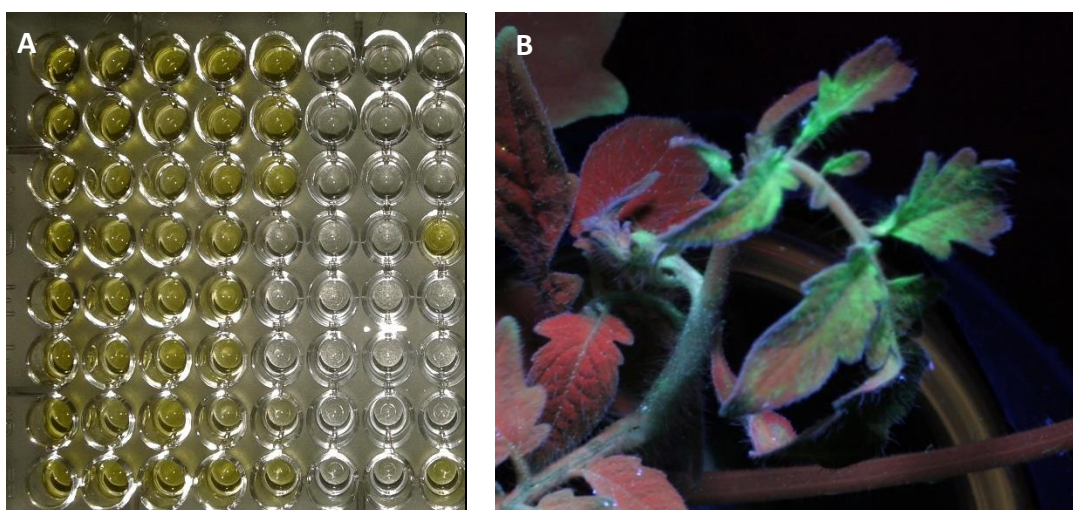


Figura 2.6. A validação do vetor TRV em plantas de tomateiro observadas 12 dias após a agroinfiltração realizada pela técnica DAS-ELISA (A) e com recurso a uma lâmpada UV (B).

2.12. Extração e quantificação de RNA por qRT-PCR

Para a quantificação da expressão relativa do mRNA do gene FRO1 foram desenhados *primers* que se ligam a zonas do gene fora da região visada para o silenciamento, para que o gene endógeno possa ser quantificado:

RT-FRO1 Fwd: 5'-TTG AGA TTC TTA CAG TCA CGA -3' e

RT-FRO1 Rev: 5'-CTT AAA CCT TTA GTC TTG GAG -3'

O RNA foi extraído de ápices radiculares, folhas jovens e folhas maduras. Foram utilizadas três repetições biológicas para cada modalidade. O RNA total foi extraído de aproximadamente 100 mg material vegetal fresco usando o reagente TRIzol® (Ambion). Eventuais contaminações do DNA foram eliminadas com o kit Turbo DNA-free (Applied Biosystems) de acordo com as instruções do fabricante. Cada amostra de RNA foi quantificada usando o espectrofotômetro NanoDrop 2000c a 260 nm e a razão de absorvância a 260 nm e 280 nm foi calculada para certificar a ausência de contaminação proteica. Para a quantificação relativa de mRNA por PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR) usou-se o kit “iScript™ One-Step RTPCR com SYBR-Green” (Bio-Rad) e a amplificação foi realizada no equipamento iCycler IQ da Bio-Rad. As misturas de amplificação foram preparadas num volume total de 15 µL contendo 7,3 µL de 2x SYBR Green master mix, 0,3 µL de cada *primer*, 0,3 µL de transcriptase reversa iScript e aproximadamente 20 ng de RNA. O volume final foi ajustado com água MQ. Os ciclos de amplificação foram os seguintes: transcrição reversa durante 10 minutos a 50°C, desnaturação durante 5 minutos a 95°C, seguido de 40 ciclos de desnaturação de 10 segundos a 95°C, 30 segundos para alinhamento a 55°C e 30 segundos a 72°C para extensão. Para quantificar os níveis de expressão de cada gene foi gerada uma curva de calibração usando uma diluição em série de sete pontos e obteve-se uma eficiência de PCR de 91,3 % para os transcritos (Pfaffl, 2001). Para cada amostra, a expressão relativa foi calculada com base na eficiência do PCR em tempo real e na diferença do limiar do ciclo entre um controlo (nestes ensaios o tratamento controlo utilizado correspondeu a plantas que cresceram sem limitações de Fe na solução nutritiva e conseqüentemente em condições ótimas de crescimento) e as amostras. A expressão relativa do gene FRO1

foi normalizada para cada amostra dividindo pelo número de raízes secundárias formadas por cada tratamento.

A razão da expressão relativa do gene de interesse foi calculada com base na eficiência do PCR em tempo real (E) e a variação do número de ciclos (ΔC) da amostra controle e da amostra desconhecida ($\Delta C = \text{Controle}; \Delta CP - \text{tratamento}$).

$$mRNA FRO1 = (1 + E)^{(\Delta C)}$$

2.13. Caracterização física e química do solo

No ensaio em vaso, foram utilizados dois tipos de solo: calcário e não calcário. A cada tipo de solo foi adicionado vermiculite e matéria orgânica (MO) na proporção de 2:1:1 para melhorar as propriedades de arejamento e drenagem. Nesta altura foram selecionadas aleatoriamente três amostras para a caracterização dos dois substratos. Foram analisados diversos parâmetros, nomeadamente: pH, condutividade elétrica (CE), capacidade de troca catiónica (CTC), equivalente do carbonato de calcário ativo (ECA), textura, P, K, o Fe extraível pelo citrato/bicarbonato/ditionite (Fe_d) e o Fe extraível através de uma solução ácida de oxalato de amónio (Fe_{ox}).

O pH foi avaliado por potenciometria em suspensões solo-água de 1:2,5 e a CE foi medida com um medidor de condutividade (WTW portátil) em suspensões solo-água de 1:5. A matéria orgânica foi analisada por oxidação usando dicromato (Walkley e Black, 1934). A textura do solo foi determinada pelo método do hidrómetro (Bouyoucos, 1962). O ECA ou calcário ativo foi extraído com oxalato de amónio e quantificado por titulação com permanganato de potássio (Drouineau, 1942). O P assimilável foi determinado pelo método de Olsen (Olsen e Sommers, 1982) com utilização de uma solução extratante de bicarbonato de sódio a pH 8,5 e quantificado por colorimetria a 880 nm. O K determinado por espectrometria de chama (Riehm, 1958). A capacidade de troca catiónica foi determinada pelo método do cloreto de bário-trietanolamina e quantificado por titulação com uma solução complexante de 0,05 N de EDTA (Mehlich, 1948). O Fe (Fe_d) extraído com citrato/bicarbonato/ditionito de acordo com Díaz et al

(2009) e Mehra e Jackson (1958). O Fe (Fe_{ox}) extraível através de uma solução ácida de oxalato de amónio fornece uma estimativa para o Fe em óxidos de Fe pouco cristalinos, foi determinado de acordo com Díaz et al. (2009) e Schwertmann (1964) com a modificação na razão solo: solução que foi de 1:200 para evitar um aumento significativo do pH no extratante devido à presença de carbonato.

2.14. Análise estatística

Os efeitos dos tratamentos de Fe foram avaliados por análise de variância (ANOVA, teste F) e quando a ANOVA produziu um valor F significativo, as médias individuais foram comparados usando o teste de comparação múltiplo de médias de Duncan (DMRT) para um intervalo de confiança de 95%. A análise estatística dos dados foi processada através do *software* SPSS® (18,0, SPSS Inc, Chicago, IL).

O valor do coeficiente de determinação (r^2) foi indicado como medida da inter-relação entre as variáveis.

Em relação ao ensaio em substrato, os principais efeitos e interações do substrato (S), tratamentos de Fe (Fe) e órgãos de plantas (O) também foram avaliados.

CAPÍTULO 3

A MEMÓRIA DO *STRESS*: DEFICIÊNCIA DE FERRO EM MORANGUEIRO

Parte deste capítulo está publicado no artigo:

Gama, F.; Saavedra, T.; Silva, J. P.; Miguel, M. G.; Varennes, A.; Correia, P. J.; Pestana, M. (2016) The memory of iron stress in strawberry plants. *Plant Physiology and Biochemistry*. Vol 104: 36–44. Doi:10.1016/j.plaphy.2016.03.019

3.1. Resumo

Com o objetivo de otimizar estratégias de correção da deficiência de Fe, foi realizado um ensaio para estudar as respostas de plantas deficientes em Fe e a posterior recuperação da deficiência. Plantas de morangueiro (*Fragaria ananassa* Duch. cv. 'Diamante') adquiridas de raiz nua foram utilizadas neste ensaio. As plantas foram transplantadas e cresceram durante 42 dias em solução nutritiva de Hoagland. Estabeleceram-se duas modalidades com base na adição de 10 μM Fe (**Fe10**), na forma de quelato Fe-EDDHA ou pela ausência do Fe (**Fe0**). Nas plantas **Fe0**, a concentração total de clorofila das folhas jovens diminuiu progressivamente ao longo do tempo, desenvolvendo sintomas típicos de clorose férrica. Após 35 dias, a concentração de Fe foi era apenas de 6% da observada em plantas que cresceram com **Fe10**. O estudo da recuperação iniciou-se nesta fase e a metade das plantas do tratamento **Fe0** foi adicionando 10 μM de Fe à solução nutritiva Fe0 (**FeR**). A recuperação total de clorofila nas folhas jovens ocorreu passados 12 dias. A atividade da quelato de ferro redutase (QFR) e as concentrações de ácido succínico e cítrico aumentaram em plantas de **FeR**. A partição de Fe revelou que as plantas do tratamento **FeR** acumularam expressivamente esse nutriente na coroa e nas flores. Esta observação parece ser devida a um mecanismo de desativação passiva da atividade da QFR, associada à síntese contínua de ácidos succínico e cítrico ao nível radicular com o aumento consequente na absorção de Fe.

3.2 Delineamento experimental

Com objetivo de estudar os fluxos e a partição do Fe em plantas de morangueiro sob condições de deficiência de Fe e as adaptações após a recuperação, foram analisados a distribuição de nutrientes e de compostos orgânicos que atuam como transportadores do Fe para diferentes órgãos da planta.

Foi delineado um ensaio em solução nutritiva com duas concentrações de Fe (**Figura 3.1**), com 10 μM de Fe (**Fe10**; n = 77 plantas) ou sem Fe (**Fe0**; n = 119 plantas). As plantas do **Fe10** (plantas controlo positivo) cresceram sem limitação de quantidade do Fe. As plantas do **Fe0** foram utilizadas como controlo negativo. Seis plantas foram colocadas

em cada caixa com o respetivo tratamento e distribuídas aleatoriamente na estufa de ensaio. As plantas que cresceram com Fe (**Fe10**) não desenvolveram sintomas durante todo o ensaio e os valores de clorofila registados foram superiores a $720 \mu\text{mol m}^{-2}$. Após 35 dias, as plantas de **Fe0** desenvolveram folhas jovens cloróticas registando valores de clorofila inferiores a $376 \mu\text{mol m}^{-2}$.

Nesta fase, as plantas cloróticas foram divididas em dois grupos (**Figura 3.1**): (i) um conjunto permaneceu sem Fe (**Fe0**), e (ii) para o outro conjunto a reposição do Fe foi feita à solução nutritiva a uma concentração de $10 \mu\text{M}$ (**FeR**). Estas condições de ensaio foram mantidas por duas semanas adicionais: **Fe0** (sempre cultivado sem Fe; $n \geq 36$); **Fe10** (plantas de controlo, sempre cultivadas com Fe; $n \geq 42$) e **FeR** (plantas cloróticas com reposição de Fe por adição de $10 \mu\text{M}$ Fe à solução nutritiva; $n \geq 20$).

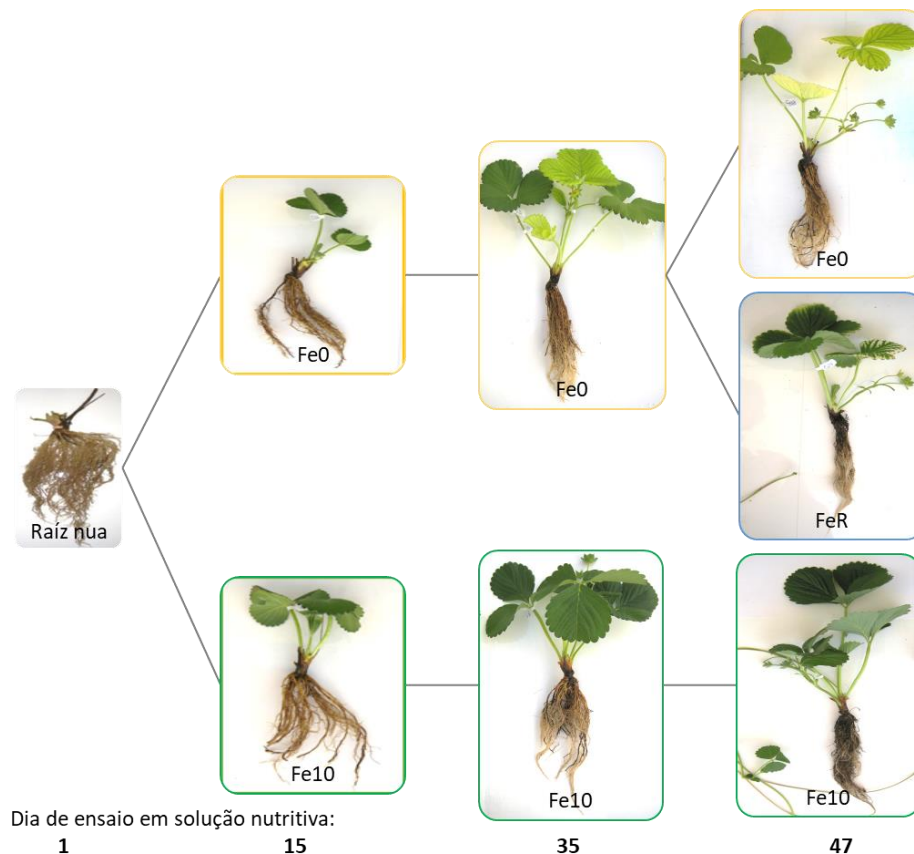


Figura 3.1. Desenho experimental com destaque para as datas de colheita, indicadas em dias de ensaio em solução nutritiva. **Fe0** - plantas que cresceram sem Fe na solução nutritiva; **Fe10** - plantas que cresceram com $10 \mu\text{M}$ de Fe na solução nutritiva; **FeR** - plantas que cresceram durante 35 dias sem Fe e depois foram transferidas para uma solução nutritiva com $10 \mu\text{M}$ de Fe.

Com o objetivo de avaliar os efeitos dos tratamentos em diversos parâmetros tais como: na biomassa, na composição mineral, na atividade da QFR e na concentração de ácidos

orgânicos, foram selecionadas e colhidas pelo menos 5 plantas por tratamento, em três datas (**Figura 3.1**):

- (i) **dia 15** ou duas semanas após a imposição dos dois tratamentos de Fe (**Fe0** e **Fe10**): as plantas de cada tratamento foram divididas em raízes, coroa, folhas jovens e flores;
- (ii) **dia 35** que correspondeu à data em que as plantas do **Fe0** desenvolveram sintomas típicos da deficiência de Fe: as plantas de cada tratamento (**Fe0** e **Fe10**) foram separadas em raízes, coroas, folhas velhas, folhas jovens e flores;
- (iii) **dia 47** ou na data final do período de recuperação: as plantas de cada tratamento (**Fe0**, **Fe10** e **FeR**) foram separadas em raízes, coroa, folhas velhas, folhas jovens, flores e estolhos.

3.3. Resultados

3.3.1. Concentração foliar de clorofila

As medições de SPAD tiveram início 12 dias após o transplante e foram efetuadas nos três folíolos da folha basal (folhas velha) e da folha apical (folha nova totalmente expandida). As leituras de SPAD foram convertidas em concentração total de clorofila ($\mu\text{mol m}^{-2}$) usando a equação de calibração para o morangueiro para a cultivar 'Diamante' (Capítulo2 - **Tabela 2.2**).

Doze dias após a transferência para a solução nutritiva as plantas do tratamento **Fe0** apresentaram valores de clorofila nas folhas jovens ($890 \mu\text{mol m}^{-2}$, **Figura 3.2A**) significativamente inferiores às plantas controle (**Fe10**; $1012 \mu\text{mol m}^{-2}$). Os sintomas típicos de deficiência de Fe tornam-se evidentes após 21 dias, mostrando uma clorose internervuras evoluindo para uma clorose generalizada nas folhas jovens (**Figura 3.3**). Após 35 dias, as folhas jovens de plantas **Fe0** apresentavam-se severamente cloróticas, apresentando conteúdo de clorofila de $200 \pm 10 \mu\text{mol m}^{-2}$, cerca de 5 vezes inferior as plantas de controle.

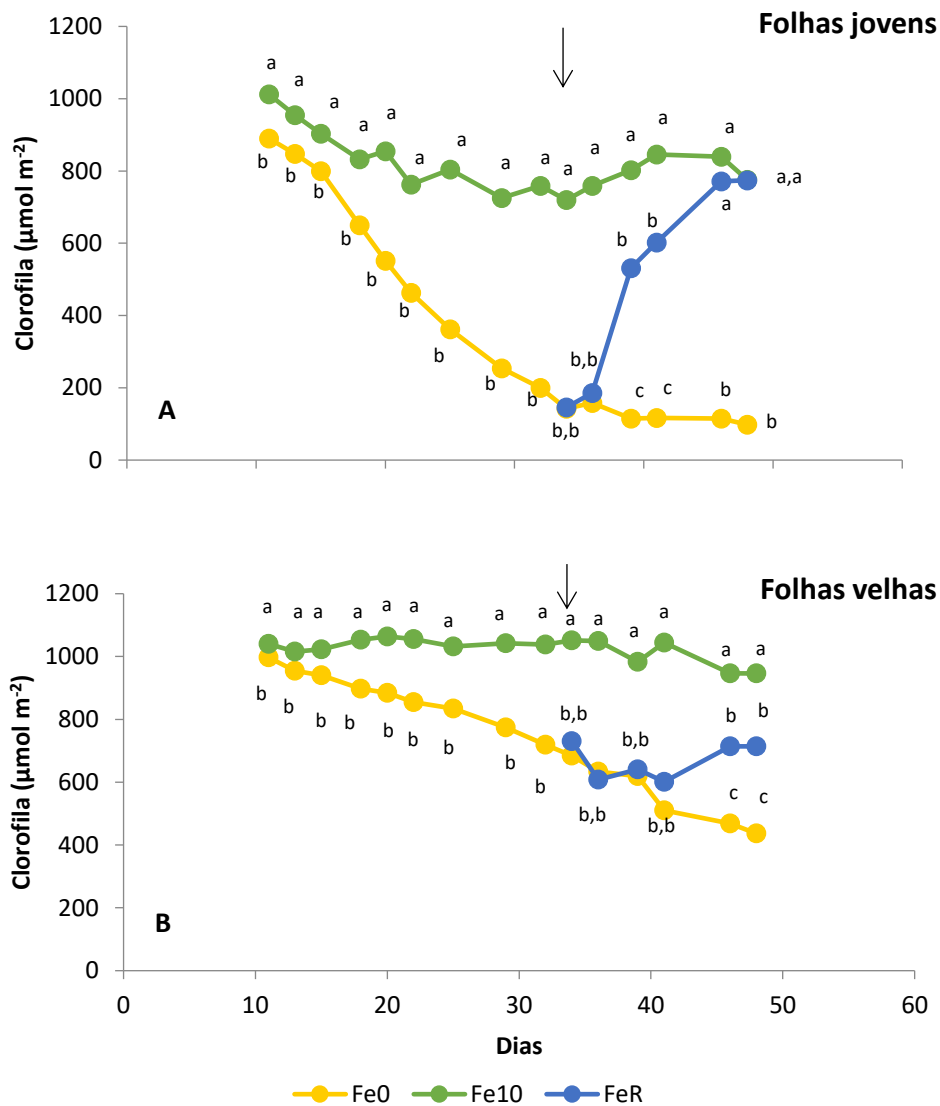


Figura 3.2. A concentração total de clorofila foliar ($\mu\text{mol m}^{-2}$) em folhas jovens (A) e em folhas velhas (B) para os diferentes tratamentos durante o período do ensaio. Tratamentos: **Fe0** - plantas que cresceram sem Fe na solução nutritiva; **Fe10** - plantas que cresceram com 10 μM de Fe na solução nutritiva; **FeR** - plantas que cresceram durante 35 dias sem Fe e depois foram transferidas para uma solução nutritiva com 10 μM de Fe. A seta indica a data de início do ensaio da recuperação. Para cada data, médias com letras diferentes são estatisticamente diferentes para $P < 0,05$ (teste de Duncan, $n \geq 20$).

O ensaio de recuperação da deficiência iniciou-se 35 dias após a instalação do ensaio. Sete dias após a reposição de Fe (dia 42 do ensaio), os teores de clorofila das folhas mais jovens do tratamento **FeR** aumentaram 4 vezes e, após 12 dias, os níveis de clorofila igualaram as plantas de controlo (**Fe10**). Nesta altura as folhas jovens desenvolveram

uma coloração verde uniformemente, indicando uma recuperação completa da deficiência de Fe (**Figura 3.3**).

Relativamente às folhas velhas, o teor de clorofila diminuiu ao longo do ensaio em plantas **Fe0**, no entanto nunca atingiu os baixos níveis observados para as folhas jovens (**Figura 3.2 B**). Nas plantas **FeR**, a concentração de clorofila nas folhas velhas aumentou, mas comparativamente às plantas **Fe10** foram significativamente inferiores.

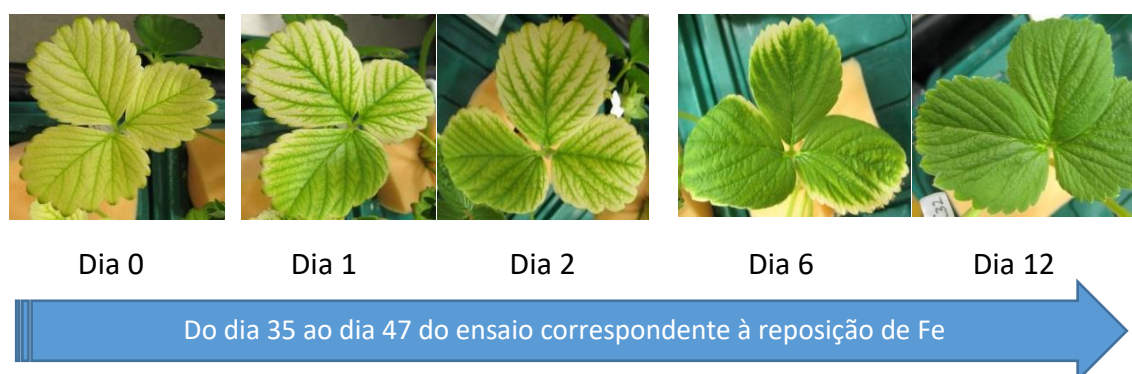


Figura 3.3. Padrão de reverdecimento de folhas jovens que decorreu durante 12 dias após a reposição de Fe (**FeR**).

3.3.2. Biomassa

Quinze dias após o início do ensaio não foram observadas diferenças significativas na partição da biomassa entre plantas **Fe0** e **Fe10** (**Figura 3.4**). No entanto, após 35 dias, a biomassa da coroa foi significativamente superior nas plantas **Fe10**, que foi associada à produção de vários estolhos. No final do ensaio, as plantas **Fe10** acumularam mais biomassa em todos os órgãos comparativamente às plantas cloróticas (**Fe0**) e às plantas recuperadas (**FeR**). Comparativamente ao **Fe0** nas plantas recuperadas (**FeR**) o aumento de biomassa foi direcionado para a coroa e as folhas jovens que no entanto não atingiram valores das plantas **Fe10**. Nos restantes órgãos não foram observadas diferenças significativas entre plantas **FeR** e **Fe0**.

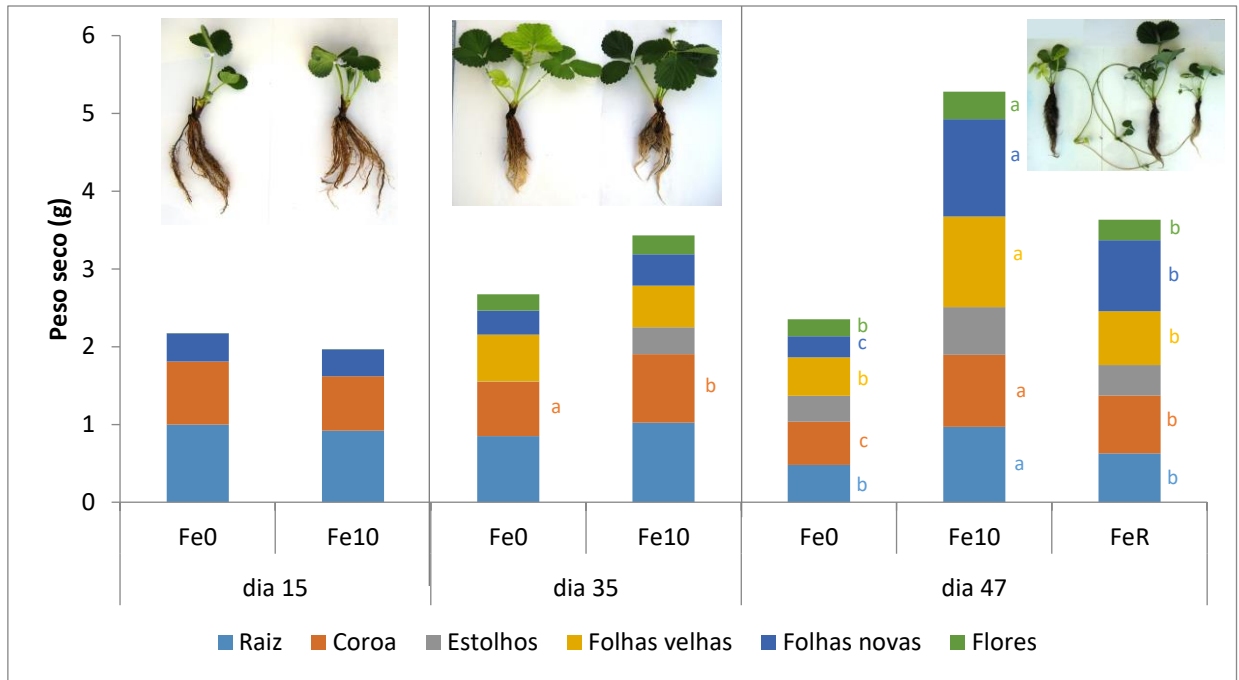


Figura 3.4. Efeito dos tratamentos na partição de biomassa (em peso seco, g) após 15, 35 e 47 dias. Tratamentos: **Fe0** - plantas que cresceram sem Fe na solução nutritiva; **Fe10** - plantas que cresceram com 10 μM de Fe na solução nutritiva; **FeR** - plantas que cresceram durante 35 dias sem Fe e depois foram transferidas para uma solução nutritiva com 10 μM de Fe. Para cada data e tipo de material vegetal, as médias com letras diferentes são estatisticamente diferentes para $P < 0,05$ (teste de Duncan). A estatística está apresentada quando existem diferenças significativas.

No final do ensaio, as plantas **Fe0** apresentaram menor sistema radicular, verificado através do registo de menor peso seco, no entanto visualmente mais ramificado comparativamente às plantas **Fe10** (**Figura 3.4**). A razão entre a parte radicular e a parte aérea foram significativamente maiores ($P < 0,05$) em plantas **Fe0**, apresentando estas, $0,35 \pm 0,02$ em comparação com $0,22 \pm 0,01$ nas plantas **Fe10** e $0,26 \pm 0,01$ para plantas **FeR**. No que diz respeito ao número de folhas, as plantas de **Fe0** apresentaram menor número comparativamente às plantas **Fe10**, enquanto as plantas de **FeR** apresentaram um valor intermediário (3,0 a 4,4 e 3,6, respetivamente, $P < 0,05$ em todos os casos).

3.3.3 Composição mineral

A composição mineral foi medida após 15, 35 e 47 dias em diferentes órgãos (**Tabela 3.1**, para macronutrientes e **Tabela 3.2**, para micronutrientes) e nas condições de crescimento.

Após 15 e 35 dias, foram encontradas diferenças ligeiras na partição de nutrientes entre os tratamentos. O nível de Cu nas raízes foi uma exceção, sendo 2,5 e 4,2 vezes superiores nas plantas **Fe0** em comparação com plantas **Fe10** respectivamente para as datas referidas e no final do ensaio (dia 47) o aumento foi de 5,7 vezes.

Curiosamente no final do período de indução de sintomas (dia 35), independentemente do órgão da planta, não foram observadas diferenças na concentração de Fe entre plantas **Fe0** e plantas de controlo **Fe10**. No final do ensaio, a concentração de N nas raízes das plantas recuperadas (**FeR**) e as concentrações de K, P e Ca na coroa mostra valores semelhantes aos obtidos nas plantas **Fe10**. Nas folhas velhas, as concentrações de N, P K e Ca nas plantas **FeR** também foram semelhantes às plantas de controlo (**Fe10**).

Quanto aos micronutrientes (**Tabela 3.2**), as concentrações de Cu na coroa e nos estolhos nas plantas **FeR** foram semelhantes às plantas **Fe10**. Além disso, nas folhas jovens, os valores de Zn foram semelhantes em ambos os tratamentos, assim como a concentração de Mn nas flores. De salientar foram as concentrações de Cu, Zn e Mn medidas nas raízes das plantas recuperadas (**FeR**), que superaram as plantas **Fe10**. Com referência à absorção do Fe, as plantas recuperadas (**FeR**) também apresentaram valores significativamente superiores de Fe nas flores, folhas e na coroa em comparação com plantas **Fe10**.

Tabela 3.1. Concentração de macronutrientes (g kg^{-1}) nos diferentes órgãos das plantas após 15, 35 e 47 dias. Tratamentos: **Fe0** - plantas que cresceram sem Fe na solução nutritiva; **Fe10** - plantas que cresceram com 10 μM de Fe na solução nutritiva; **FeR** - plantas que cresceram durante 35 dias sem Fe e depois foram transferidas para uma solução nutritiva com 10 μM de Fe. Os resultados são médias \pm erro padrão. Letras diferentes significam resultados significativamente diferentes em $P < 0,05$ (teste de Duncan). Diferenças significativas são indicadas: *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$; ns, não significativo; nd, não determinado. ^ACorresponde a um valor único.

		N		P		g kg^{-1} K		Mg		Ca	
Dia 15											
Flores	Fe0	nd		9,5 \pm 0,7	ns	33 \pm 1,3	ns	4,0 \pm 0,3	ns	11,1 \pm 0,6	ns
	Fe10	nd		8,0 \pm 0,4		29 \pm 3,1		3,6 \pm 0,2		10,1 \pm 0,9	
Folhas jovens	Fe0	50 \pm 1,6	ns	9,5 \pm 0,2	**	41 \pm 1,3	ns	3,7 \pm 0,1	ns	10,8 \pm 0,7	ns
	Fe10	47 \pm 1,8		7,7 \pm 0,4		39 \pm 1,7		3,7 \pm 0,1		9,3 \pm 0,5	
Coroa	Fe0	18 \pm 0,2	ns	2,7 \pm 0,1	ns	14 \pm 0,8	ns	2,5 \pm 0,1	ns	10,2 \pm 0,4	**
	Fe10	17 \pm 1,0		2,8 \pm 0,1		11 \pm 0,6		2,4 \pm 0,2		7,6 \pm 0,5	
Raizes	Fe0	22 \pm 0,3	ns	3,7 \pm 0,1	ns	12 \pm 0,2	*	3,6 \pm 0,2	ns	7,9 \pm 0,5	ns
	Fe10	21 \pm 0,4		3,6 \pm 0,2		11 \pm 0,1		3,8 \pm 0,4		6,0 \pm 0,4	
Dia 35											
Flores	Fe0	28 \pm 1,3	ns	7,4 \pm 0,2	ns	41 \pm 1,4	*	4,4 \pm 0,4	ns	9,5 \pm 0,4	**
	Fe10	29 \pm 0,5		6,3 \pm 0,5		36 \pm 0,6		3,6 \pm 0,2		7,4 \pm 0,5	
Folhas jovens	Fe0	36 \pm 0,8	*	7,2 \pm 0,2	*	38 \pm 0,4	ns	4,3 \pm 0,0	ns	9,5 \pm 0,4	*
	Fe10	33 \pm 0,1		6,6 \pm 0,1		41 \pm 1,4		4,2 \pm 0,0		12,3 \pm 0,8	
Folhas velhas	Fe0	35 \pm 0,1	**	8,4 \pm 0,3	ns	53 \pm 1,5	**	5,4 \pm 0,1	**	17,5 \pm 0,4	***
	Fe10	36 \pm 0,1		7,5 \pm 0,2		44 \pm 0,6	*	4,3 \pm 0,1	*	13,9 \pm 0,5	
Coroa	Fe0	16 \pm 0,3	*	3,0 \pm 0,1	ns	15 \pm 0,5	ns	2,8 \pm 0,0	*	9,8 \pm 0,0	***
	Fe10	17 \pm 0,3		2,8 \pm 0,1		13 \pm 0,5		3,1 \pm 0,1		10,8 \pm 0,1	
Raizes	Fe0	20 \pm 0,3	**	4,6 \pm 0,1	ns	11 \pm 0,5	ns	4,4 \pm 0,3	ns	8,4 \pm 0,3	ns
	Fe10	22 \pm 0,2		4,9 \pm 0,4		12 \pm 1,1		3,7 \pm 0,2		9,3 \pm 0,3	
Dia 47											
Flores	Fe0	25 \pm 1		8 \pm 0	b	37 \pm 2		4 \pm 0	a	10 \pm 0	
	Fe10	28 \pm 1	ns	9 \pm 0	a	41 \pm 1	ns	3 \pm 0	b	10 \pm 0	ns
	FeR	27 \pm 1		7 \pm 0	b	42 \pm 2		4 \pm 0	a	10 \pm 1	
Folhas jovens	Fe0	32 \pm 0,7	ab	10,9 \pm 0,6	a	36 \pm 0,7		4,0 \pm 0,1	a	10,8 \pm 0,1	a
	Fe10	31 \pm 0,5	b	6,6 \pm 0,2	b	32 \pm 0,6	ns	2,7 \pm 0,0	c	8,2 \pm 0,1	c
	FeR	34 \pm 0,4	a	7,0 \pm 0,1	b	34 \pm 1,4		3,7 \pm 0,1	b	9,7 \pm 0,1	b
Folhas velhas	Fe0	28 \pm 0,6	b	8,4 \pm 0,4	a	50 \pm 1,7	a	4,9 \pm 0,2	a	15,9 \pm 0,9	a
	Fe10	31 \pm 0,4	a	7,3 \pm 0,1	b	39 \pm 0,2	b	3,7 \pm 0,1	c	13,6 \pm 0,3	b
	FeR	33 \pm 0,5	a	7,1 \pm 0,1	b	39 \pm 0,6	b	4,4 \pm 0,1	b	12,2 \pm 0,6	b
Estolhos	Fe0	27 ^A		6,3 \pm 0,5		29 \pm 1,9	b	3,2 \pm 0,3	a	7,5 \pm 1,8	a
	Fe10	24 \pm 0,1	nd	6,9 \pm 0,2	ns	34 \pm 0,3	a	2,2 \pm 0,1	b	4,8 \pm 0,1	ab
	FeR	26 ^A		8,7 \pm 2,9		33 \pm 1,5	ab	2,3 \pm 0,3	b	4,3 \pm 0,2	b
Coroa	Fe0	17 \pm 0,3	a	6,0 \pm 0,3	a	12 \pm 0,8	b	3,3 \pm 0,1		11,5 \pm 0,4	a
	Fe10	14 \pm 0,2	c	3,7 \pm 0,0	b	17 \pm 0,6	a	2,8 \pm 0,0	ns	9,4 \pm 0,1	b
	FeR	15 \pm 0,4	b	4,4 \pm 0,1	b	16 \pm 0,4	a	3,1 \pm 0,3		10,0 \pm 0,6	b
Raizes	Fe0	20 \pm 0,7	b	6,8 \pm 1,1		11 \pm 1,1		4,2 \pm 0,6		9,9 \pm 0,1	a
	Fe10	24 \pm 0,4	a	7,1 \pm 0,1	ns	11 \pm 0,5	ns	4,2 \pm 0,2	ns	9,3 \pm 0,1	a
	FeR	23 \pm 0,9	a	6,9 \pm 0,2		11 \pm 0,9		4,4 \pm 0,3		7,9 \pm 0,3	b

Tabela 3.2. Concentração de micronutrientes (mg kg⁻¹) nos diferentes órgãos das plantas após 15, 35 e 47 dias. Tratamentos: **Fe0** - plantas que cresceram sem Fe na solução nutritiva; **Fe10** - plantas que cresceram com 10 µM de Fe na solução nutritiva; **FeR** – plantas que cresceram durante 35 dias sem Fe e depois foram transferidas para uma solução nutritiva com 10 µM de Fe. Os resultados são médias ± erro padrão, Letras diferentes significam resultados significativamente diferentes em P <0,05 (teste de Duncan). Diferenças significativas são indicadas: *, P <0,05; **, P <0,01; ***, P <0,001; ns, não significativo.

		mg kg ⁻¹							
		Cu	Zn	Mn	Fe				
Dia 15									
Flores	Fe0	32±5	*	29±3	***	406±18	ns	238±94	ns
	Fe10	56±1		88±8		446±48		250±3	
Folhas jovens	Fe0	13±1	ns	37±3	ns	633±67	ns	130±25	ns
	Fe10	14±0		34±0		563±66		157±5	
Coroa	Fe0	13±1	ns	60±5	ns	368±26	*	907±61	ns
	Fe10	11±1		62±2		279±25		1087±108	
Raizes	Fe0	40±5	***	79±1	**	677±36	ns	1159±118	ns
	Fe10	16±1		96±3		518±133		1414±70	
Dia 35									
Flores	Fe0	16±2	ns	42±3	*	250±14	ns	41±10	ns
	Fe10	14±3		50±2		369±75		60±5	
Folhas jovens	Fe0	17±1	ns	43±4	ns	306±10	ns	48±5	ns
	Fe10	16±1		39±1		363±29		59±2	
Folhas velhas	Fe0	16±1	**	30±1	**	617±24	ns	93±4	ns
	Fe10	13±0		35±1		674±29		122±16	
Coroa	Fe0	15±0	*	70±2	***	233±14	**	730±56	ns
	Fe10	10±1		84±4		263±6		689±17	
Raizes	Fe0	131±5	***	181±8	***	1135±76	*	1311±108	ns
	Fe10	31±2		125±6		876±16		1645±189	
Dia 47									
Flores	Fe0	12±1		34±2	ab	280±14	b	36±6	b
	Fe10	9±1	ns	40±2	a	297±10	ab	10±2	b
	FeR	9±1		28±1	b	333±18	a	74±7	a
Folhas jovens	Fe0	19±2		39±2	a	382±24	a	58±6	b
	Fe10	12±1	ns	23±1	b	195±10	b	65±3	b
	FeR	9±4		25±1	b	334±13	a	120±12	a
Folhas velhas	Fe0	3±1	b	36±2	a	504±16	a	49±5	b
	Fe10	5±0	b	31±1	b	386±3	b	46±2	b
	FeR	11±2	a	24±1	c	442±29	ab	82±6	a
Estolhos	Fe0	19±4	a	45±5		179±17	a	26±4	b
	Fe10	6±2	b	35±4	ns	115±7	b	55±3	ab
	FeR	9±1	b	33±6		153±28	ab	82±14	a
Coroa	Fe0	24±5	a	94±5		213±11	a	950±15	a
	Fe10	16±1	ab	92±2	ns	147±6	c	513±4	b
	FeR	11±2	b	91±2		202±15	b	1131±131	a
Raizes	Fe0	153±5	a	346±9	a	1519±63	a	1187±49	
	Fe10	27±2	c	154±13	c	614±22	c	1201±107	ns
	FeR	42±3	b	233±6	b	1101±30	b	1427±107	

O Fe acumulou-se preferencialmente nas raízes e na coroa (**Figura 3.5**). No dia 15 não foram encontradas diferenças significativas no teor total de Fe em plantas controle (**Fe10**, 2173 $\mu\text{g planta}^{-1}$) comparativamente às plantas que cresceram sem Fe (**Fe0**, 1781 $\mu\text{g planta}^{-1}$). No dia 35, as plantas de **Fe10** apresentaram um teor de Fe significativamente superior nas raízes e nas flores. No final do ensaio, as plantas **FeR** atingiram os teores de Fe das plantas **Fe10** em vários órgãos, nomeadamente nas raízes, nas folhas velhas e nas folhas jovens. Surpreendentemente, os teores de Fe observados na coroa e nas flores das plantas recuperadas (**FeR**) foram significativamente superiores às plantas controle que cresceram sempre com Fe (**Fe10**). O teor de Fe na coroa destas plantas (**FeR**) foi quase o dobro comparativamente às plantas **Fe10** enquanto nas flores o aumento foi de 40%.

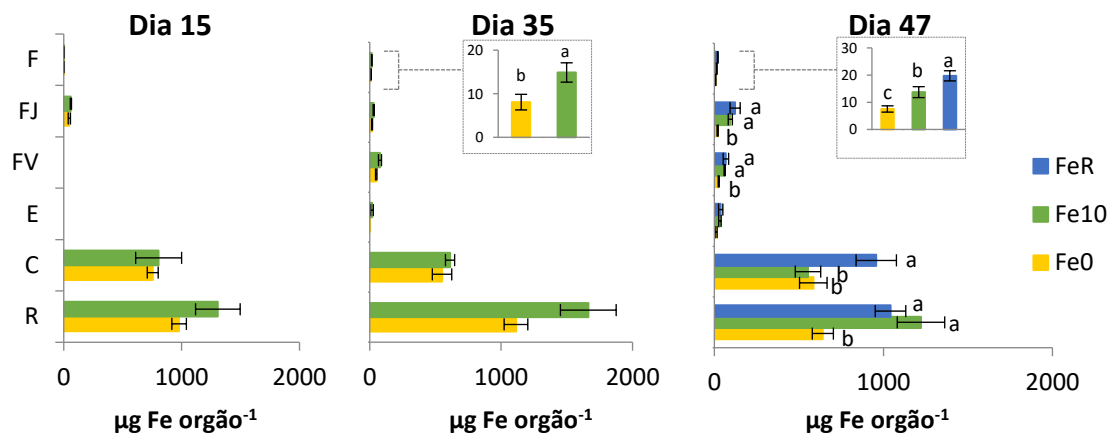


Figura 3.5. Teor de Fe (μg de Fe) determinado dos diferentes órgãos nos dias 15, 35 e 47. R, raízes; C, coroa; E, estolhos; FV, folhas velhas; FJ, folhas jovens; F, flores. Tratamentos: **Fe0** - plantas que cresceram sem Fe na solução nutritiva; **Fe10** - plantas que cresceram com 10 μM de Fe na solução nutritiva; **FeR** - plantas que cresceram durante 35 dias sem Fe e depois foram transferidas para uma solução nutritiva com 10 μM de Fe. As barras do erro padrão estão indicadas para cada média. Letras diferentes significam resultados significativamente diferentes em $P < 0,05$ (teste de Duncan).

3.3.4. Atividade da QFR

No final da indução de sintomas (35 dias), o pH na solução nutritiva foi idêntico nos dois tratamentos ($6,0 \pm 0,5$). No entanto, a atividade da QFR determinada em ápices

radiculares foi superior nas plantas **Fe10** comparativamente às plantas **Fe0** (**Figura 3.6**). A atividade diminuiu ao longo do ensaio, verificando-se, após 15 dias, 15 e 21 nmol de Fe (II) $\text{min}^{-1} \text{g}^{-1}$ PF nas plantas **Fe0** e **Fe10**, respectivamente, diminuiu para 6 e 9 nmol de Fe (II) $\text{min}^{-1} \text{g}^{-1}$ PF no final do ensaio (dia 47). Foram observadas alterações morfológicas radiculares após 20 dias de ensaio nas plantas **Fe0**, como o desenvolvimento de raízes secundárias. No final do ensaio a tendência de diminuição da atividade QFR manteve-se, não havendo diferenças significativas entre os tratamentos. No entanto, a emissão de raízes secundárias diminuiu nas plantas **FeR** entre os dias 37 e 41.

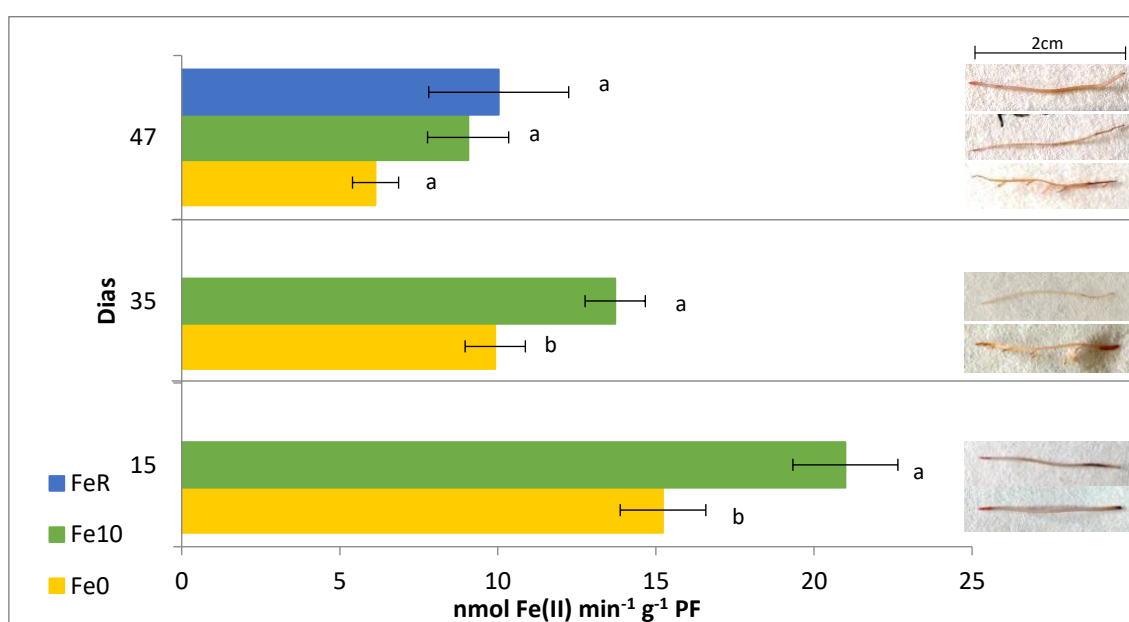


Figura 3.6. Atividade da QFR avaliada em ápices radiculares ($\text{nmol Fe (II) min}^{-1} \text{g}^{-1}$ PF) para cada tratamento, 15, 35 e 47 dias após o início do ensaio. Tratamentos: **Fe0** - plantas que cresceram sem Fe na solução nutritiva; **Fe10** - plantas que cresceram com 10 μM de Fe na solução nutritiva; **FeR** – plantas que cresceram durante 35 dias sem Fe e depois foram transferidas para uma solução nutritiva com 10 μM de Fe. As médias resultam de pelo menos 9 replicados e o erro padrão está representado. Letras diferentes significam resultados significativamente diferentes em $P < 0,05$ (teste de Duncan),

3.3.5. Ácidos orgânicos

A quantificação de ácidos orgânicos foi realizada por LC-MS (procedimento descrito no capítulo 2.8). Cada amostra foi analisada para ácidos succínico, málico e cítrico e a

quantificação foi calculada utilizando as áreas de cada pico como exemplificado na **Figura 3.7**.

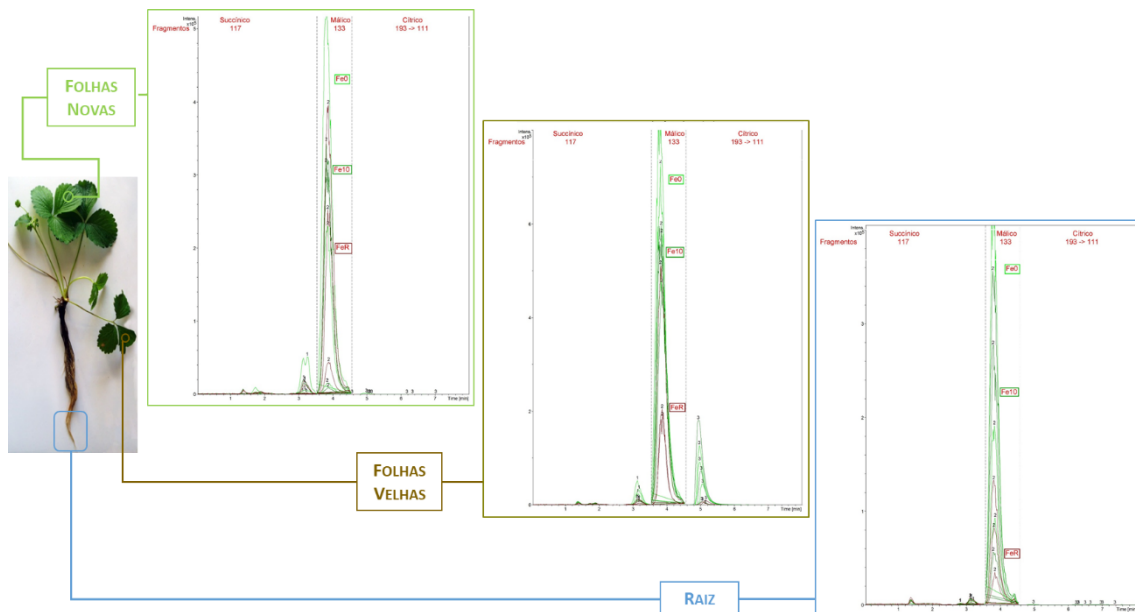


Figura 3.7. Exemplos de perfis de LC-MS / MS nos diferentes órgãos da planta (raízes, folhas velhas e folhas jovens) analisados no final do ensaio.

Diferenças na concentração de ácidos orgânicos foram observadas principalmente entre folhas velhas e raízes (**Figura 3.8**) das plantas **Fe0** e **Fe10**. No final do ensaio, os ácidos sucínico e cítrico aumentaram nas raízes das plantas de **FeR** comparativamente às plantas **Fe0** e **Fe10**, enquanto nas folhas velhas a concentração dos ácidos foi semelhante às plantas **Fe10**.

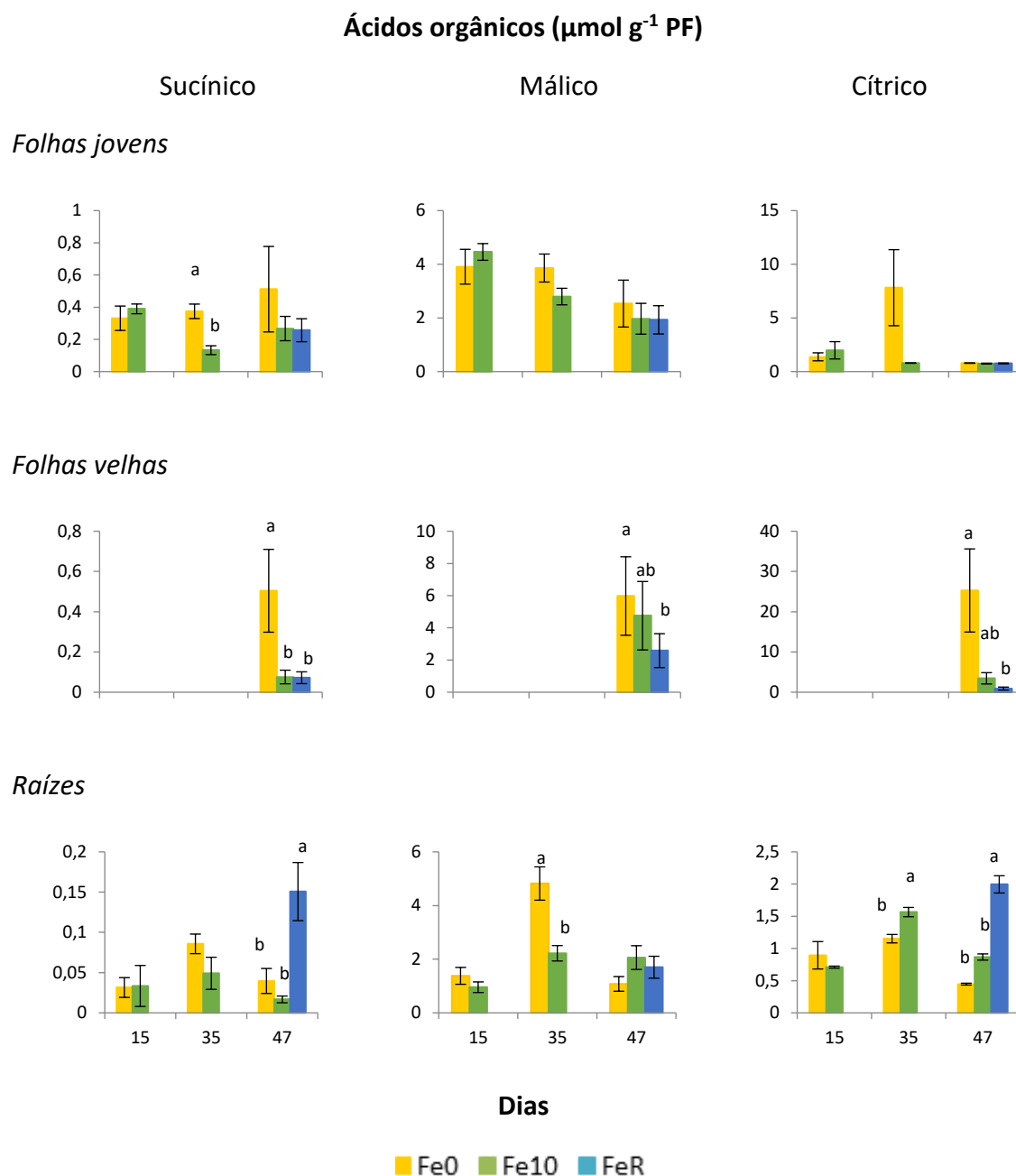


Figura 3.8. Concentrações de ácidos orgânicos (em $\mu\text{mol g}^{-1}$ PF) nas folhas jovens e velhas e nas raízes 15, 35 e 47 dias após o início do ensaio. Tratamentos: **Fe0** - plantas que cresceram sem Fe na solução nutritiva; **Fe10** - plantas que cresceram com 10 μM de Fe na solução nutritiva; **FeR** - plantas que cresceram durante 35 dias sem Fe e depois foram transferidas para uma solução nutritiva com 10 μM de Fe. As médias têm indicação do erro padrão de pelo menos 3 replicados. Letras diferentes significam resultados significativamente diferentes para $P < 0,05$ (teste de Duncan).

Resumidamente, a parte aérea das plantas de Fe0 apresentaram uma tendência para acumular ácidos orgânicos enquanto nas raízes verificou-se o oposto.

3.4. Discussão

As plantas de morangueiro são conhecidas por serem muito suscetíveis à deficiência de Fe (Kafkas *et al.*, 2007; Torun *et al.*, 2013). Os sintomas típicos de deficiência de Fe foram observados principalmente nas folhas jovens.

Resultados obtidos num estudo prévio na cultivar ‘Diamante’ indicaram cloroses nas folhas jovens, no entanto foi mostrado que o *stress* de Fe não induziu danos permanentes no aparelho fotossintético (Osório *et al.*, 2014). Em concordância com este trabalho está a recuperação ou reverdecimento total das folhas jovens, observado nas plantas **FeR**. A resposta à reposição do Fe pode ser justificada através do acesso rápido no transporte do Fe via xilema para folhas jovens (Pestana *et al.*, 2012a). Esta eficiência metabólica também leva à recuperação significativa no final do ensaio da biomassa nas plantas **FeR**, embora com uma acumulação menor que a observada para plantas que cresceram sempre na presença de Fe (**Fe10**).

Segundo um estudo da deficiência de Fe realizado em morangueiro da cultivar ‘Selva’ (Pestana *et al.*, 2012a) foi relatado um aumento da atividade da QFR radicular em conjunto com uma acidificação da solução nutritiva, em condições de *stress* de Fe. Estas ocorrências foram descritas para várias espécies (Pestana *et al.*, 2012a; Pestana *et al.*, 2013; Torun *et al.*, 2013). Contrariamente, no ensaio verificou-se uma atividade radicular menor em plantas cloróticas (**Fe0**) em comparação com as plantas de controlo (**Fe10**). Esta resposta pode estar relacionada com o crescimento rápido característico desta cultivar, que é uma estratégia muitas vezes observada em espécies que registram baixa atividade da QFR em condições de deficiência de Fe (Jiménez *et al.*, 2008; Pestana *et al.*, 2012b) outra hipótese a considerar será uma baixa tolerância à deficiência de Fe. Resultados semelhantes foram obtidos por Venturas *et al.* (2014) que relataram em ulmeiros com deficiência de Fe uma menor atividade da QFR em comparação com plantas que desenvolveram em condições suficientes de Fe. Comportamento semelhante também foi relatado na videira e no tomateiro (Siminis e Stavrakakis, 2008; Zouari *et al.*, 2001).

Para racionalizar os resultados, colocamos a hipótese que a atividade radicular da QFR da cultivar ‘Diamante’ parece ser regulada pelo próprio Fe. As plantas cloróticas

apresentaram adaptações morfológicas a nível radicular como o aumento do número de ápices laterais com a zona subapical dilatada. Esta mudança morfológica pode amplificar os pontos de redução nas raízes, permitindo uma maior absorção de Fe (Pestana *et al.*, 2011). Após a reposição do Fe, ocorreu um aumento da redução observado pelos valores da QFR no dia 47, explicando assim os altos teores de Fe acumulados em todos os órgãos das plantas recuperadas. Enquanto as plantas que cresceram sem limitação de Fe acumularam Fe principalmente em folhas velhas, as plantas recuperadas alteraram o padrão de absorção, mobilizando e Fe para as flores e coroa.

Em função das condições ambientais, a coroa produz três tipos de gomos podendo diferenciar-se em folhas, inflorescências ou estolhos (Costes *et al.*, 2014; Heide *et al.*, 2013; Menzel e Smith, 2014) e, sob condições de *stress*, é possível que as plantas tenham mudado o percurso e a translocação de nutrientes entre órgãos. Nas plantas recuperadas o incremento de Fe nas flores é um resultado particularmente interessante. Foi mostrado por Valentinuzzi *et al.* (2015) que morangueiros cultivados sob deficiência de Fe e P, tendem a acumular uma concentração superior de vários compostos benéficos para a saúde, como ácido benzóico e flavonoides nos frutos. Este resultado apontou para uma gestão seletiva de nutrientes como ferramenta para melhorar características específicas da qualidade do fruto. Os frutos não foram analisados neste ensaio, no entanto é espectável que o incremento evidente do teor de Fe seja alargado para as partes edíveis das plantas.

Em condições de deficiência de Fe (**Fe0**), as plantas acumularam N e P na coroa e K nas folhas velhas. O Cu e o Zn acumularam em vários órgãos e, na maioria dos casos, as concentrações foram superiores comparativamente às plantas controlo. É possível que o Cu possa ser absorvido substituindo o Fe em condições de ausência de Fe (Pestana *et al.*, 2013), uma vez que existe uma interação fisiológica entre os dois metais (Cohu e Pilon, 2007; Fox, 2003; Palmer e Guerinot, 2009). No entanto, não pode ser descartado um possível “efeito de concentração”, tendo em conta que as plantas Fe0 apresentaram menor biomassa. A reposição de Fe à solução nutritiva levou a um reverdecimento total, absorção de Fe e outros resultados específicos. A QFR tem capacidade de reduzir outros micronutrientes tais como, Mn^{3+} e Cu^{2+} , e os transportadores de Fe também são capazes

de transportar outros micronutrientes que podem se mover facilmente na seiva xilémica (Grusak *et al.*, 1999; Pestana *et al.*, 2013). O aumento do N nas folhas velhas pode estar relacionado com a biossíntese da clorofila e, concomitantemente, à acumulação de proteínas, uma exigência para atender ao novo requisito de crescimento nas plantas recuperadas.

As concentrações de ácidos orgânicos nas folhas velhas e jovens aumentaram como resultado da deficiência de Fe (**Fe0**), resultado que parece ocorrer em várias espécies para atingir necessidades energéticas adicionais, extrusão de protões, solubilização de Fe por redução primária e subsequentemente absorção e translocação na planta (Larbi *et al.*, 2010; López-Millán *et al.*, 2009).

Correia *et al.* (2014) descreveram a importância do ácido málico e cítrico na homeostase de Fe. Em plantas com deficiência de Fe a diminuição nas concentrações de ácido málico e cítrico nas raízes pode ser devida à exsudação radicular, com finalidade de quelatar o Fe na rizosfera e consequente absorção (López-Millán *et al.*, 2009). No entanto, após a reposição do Fe, o aumento de ácido succínico e ácido cítrico ocorreu principalmente nas raízes e não nas folhas, o que pode ser interpretado como um efeito direto da adição de Fe à solução nutritiva. A hipótese é que o excesso de ácidos presente nas folhas velhas em plantas cloróticas foi mobilizados para o sistema radicular, após o processo de recuperação, como resposta à sinalização do Fe no processo de recuperação. Nesta visão, ocorreu algum mecanismo *upregulation*.

3.5. Conclusão

Concluindo, nas condições experimentais apresentadas neste trabalho, um pulso de Fe fornecido na solução nutritiva a plantas cloróticas de morangueiro levou à recuperação da deficiência em 12 dias. A partição de Fe foi direcionada para a coroa e para as flores que podem ser devidas a um mecanismo de desativação lenta da atividade da QFR associada à acumulação de ácidos succínico e cítrico ao nível radicular e consequentemente permitiu maior absorção de Fe.

3.6. Agradecimentos

Este estudo foi financiado pelo Projeto Nacional da FCT - Fundação para Ciência e Tecnologia: PTDC/AGR-PRO/3861/2012, A F. Gama agradece a FCT a bolsa de doutoramento: SFRH/BD/89521/2012.

CAPÍTULO 4

SILENCIAMENTO DO GENE FRO1

Partes deste capítulo encontram-se publicadas ou em preparação para publicação:

F. Gama, T. Saavedra, S. Dandlen, A. de Varennes, P. J. Correia, M. Pestana and G. Nolasco (2017) Silencing of the FRO1 gene and its effects on iron uptake and homeostasis in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Physiology and Biochemistry*. Vol 114:111-118. Doi: 10.1016/j.plaphy.2017.03.004

F. Gama, T. Saavedra, S. Dandlen, A. de Varennes, P. J. Correia, M. Pestana and G. Nolasco (2017) Effects of FRO1 gene silencing in *Lycopersicum esculentum* under iron deficiency. Em preparação.

4.1. Resumo

Para avaliar o papel dinâmico da enzima QFR na homeostase do Fe e identificar possíveis percursos de regulação da sua atividade em diferentes órgãos vegetais foram estabelecidos dois ensaios recorrendo ao silenciamento de genes induzidos por vírus (*Virus Induced Gene Silencing*, VIGS): um com a *Nicotiana benthamiana* e outro com *Lycopersicum esculentum*. O vetor viral TRV (*Tobacco rattle virus*) foi usado para a construção do vetor VIGS utilizado no silenciamento do gene da *ferric reductase oxidase* (FRO1) que codifica a enzima QFR.

As plantas de *Nicotiana benthamiana* foram divididas em dois grupos, no primeiro as plantas foram usadas como controlo (sem vetor VIGS) e no segundo as plantas foram inoculadas com o vetor VIGS (plantas silenciadas). Foram ainda testados dois níveis de Fe na solução nutritiva (0 ou 2,5 μM de Fe). No total foram efetuados quatro tratamentos: dois níveis de Fe na solução nutritiva (0 ou 2,5 μM de Fe), cada um com plantas silenciadas (**VIGS-0**; **VIGS-2.5**) ou não silenciadas (controlo: **0** e **2.5**). As plantas que cresceram sem Fe (**0**; **VIGS-0**) desenvolveram sintomas típicos de deficiência de Fe nas folhas jovens. Para comprovar que o silenciamento do gene FRO1 ocorreu, a reposição de Fe (R) foi feita adicionando 2,5 μM de Fe à solução nutritiva a dois subconjuntos de plantas cloróticas (**0-R**; **VIGS-R**, respetivamente sem e com silenciamento do gene FRO1). Doze dias após a reposição de Fe, as plantas que provinham da solução sem Fe reverdesceram enquanto as plantas que tinham sido silenciadas (**VIGS-R**) permaneceram cloróticas. Nestas últimas, a expressão do gene FRO1 e a atividade de QFR foram consideravelmente reduzidas, impedindo assim a absorção do Fe. Com recurso à técnica VIGS, foi possível silenciar o gene FRO1 em *Nicotiana benthamiana* e salientar a sua importância na síntese de clorofila e na partição do Fe na planta.

No segundo ensaio recorreu-se novamente à técnica VIGS para complementar os resultados obtidos no primeiro ensaio e tentar clarificar o papel do gene FRO1 agora em plantas de *Lycopersicum esculentum* da cultivar 'Cherry' e identificar os possíveis percursos alternativos de regulação da atividade da enzima QFR. Para tal, plantas de tomateiro germinadas em substrato foram transferidas para solução nutritiva de

Hoagland a meia força quando apresentavam duas folhas verdadeiras, contendo 0,5 μM de Fe na forma de Fe-EDDHA onde permaneceram durante 10 dias. Nesta altura as plantas foram divididas em 3 grupos cada um correspondendo aos seguintes tratamentos: controlo (plantas sem agroinfiltração, **0.5**); controlo do vetor (plantas com agroinfiltração do TRV-GFP, **GFP-0.5**) e por último, com o gene da FRO1 silenciado (plantas com agroinfiltração com o vetor VIGS, **VIGS-0.5**). Aproximadamente quatro semanas depois, as plantas **VIGS-0.5** apresentaram uma diminuição mais acentuada no teor de clorofila comparativamente às plantas **0.5** e **GFP-0.5**. A atividade radicular da QFR e a expressão relativa do gene FRO1 também foi significativamente menor em plantas **VIGS-0.5**. Nesta data, as plantas de cada um dos três tratamentos (**0**, **GFP-0.5** e **VIGS-0.5**) foram por sua vez divididas em três grupos: i) o primeiro continuou a crescer nas mesmas condições - com 0,5 μM de Fe na solução nutritiva (tratamentos: **0.5**; **GFP-0.5** e **VIGS-0.5**); ii) ao segundo grupo de plantas foi retirado o Fe da solução nutritiva, passando estas a crescerem sem Fe (tratamentos: **0**; **GFP-0** e **VIGS-0**) e, iii) ao terceiro, foi adicionado 10 μM de Fe (tratamentos **10**; **GFP-10** e **VIGS-10**) com o objetivo de avaliar a recuperação da clorose férrica anteriormente induzida. No final do período experimental (40 dias), os valores de clorofila das plantas silenciadas (**VIGS-0**; **VIGS-0.5** e **VIGS-10**) variaram em função da disponibilidade de Fe na solução nutritiva. Embora tenha ocorrido reverdecimento foliar nas plantas **VIGS-0.5** e **VIGS-10**, os valores de clorofila de **VIGS-10** não atingiram os valores apresentados nas plantas controlo **10**.

4.2. Ensaio 1 – *Nicotiana benthamiana*

4.2.1. Delineamento experimental

Foram testados dois níveis de Fe: 0 (sem Fe) e 2,5 μM de Fe na forma de Fe-EDDHA, resultando no final em quatro modalidades: i) plantas sem vetor VIGS e sem Fe (**0**) ou ii) com 2,5 μM de Fe (**2.5**); na solução nutritiva; e iii) plantas com vetor VIGS sem Fe (**VIGS-0**) ou iv) com 2,5 μM de Fe (**VIGS-2.5**). Na **Figura 4.1** estão apresentadas as datas de implementação das modalidades estabelecidas ao longo do ensaio.

Após 37 dias, as plantas que cresceram com 2,5 μM de Fe independentemente de conterem ou não o vetor VIGS permaneceram verdes, mas as plantas que crescem sem Fe desenvolveram sintomas de clorose férrica nas folhas jovens.

Nesta fase, as plantas cloróticas (**0** e **VIGS-0**) foram divididas em dois grupos. Metade permaneceu a crescer sem Fe e às restantes foi adicionado 2,5 μM de Fe à solução nutritiva de forma a avaliar o comportamento destas plantas na recuperação da deficiência. Estes tratamentos foram identificados como: **0-R** e **VIGS-R** (Figura 4.1).

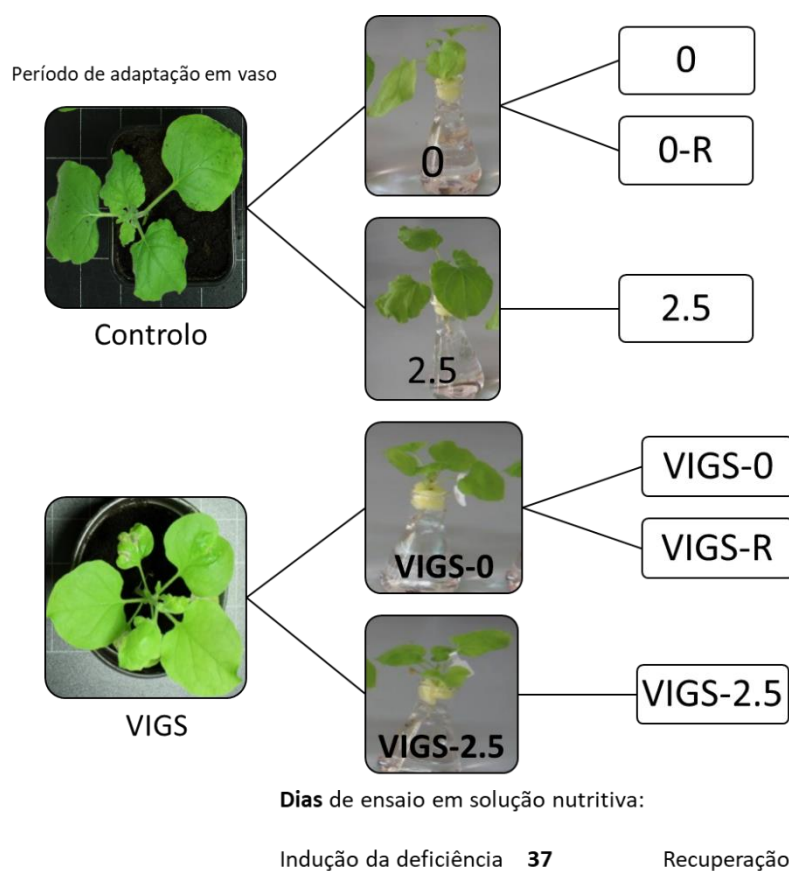


Figura 4.1. Delineamento experimental com destaque dos dias de ensaio das diferentes modalidades estabelecidas em solução nutritiva.

4.2.2 Resultados

O grau de clorose foi determinado em folhas jovens (apicais) e em folhas velhas (basais) pelo menos duas vezes por semana usando o dispositivo SPAD e as leituras posteriormente convertidas em concentração total de clorofila ($\mu\text{mol m}^{-2}$) usando a equação de calibração para a *Nicotiana benthamiana* (Capítulo 2 - Tabela 2.2). As

medições começaram depois das plantas serem transferidas para a solução nutritiva (Dia 1).

Os valores de clorofila decresceram nas folhas jovens das plantas privadas de Fe (**Figura 4.2**). Nas plantas **VIGS-0** as folhas jovens desenvolveram sintomas típicos de clorose férrica cinco dias após o crescimento sem Fe (clorofila = $265 \pm 47 \mu\text{mol m}^{-2}$). Os sintomas das plantas **0** (clorofila = $234 \pm 32 \mu\text{mol m}^{-2}$) foram retardados e ocorreram apenas 10 dias após o início do crescimento sem Fe. As plantas que cresceram sem limitação de Fe na solução nutritiva: **2.5** e **VIGS-2.5**, mantiveram os valores de clorofila acima de $440 \mu\text{mol m}^{-2}$ nas folhas jovens durante todo o ensaio, independentemente do tratamento.

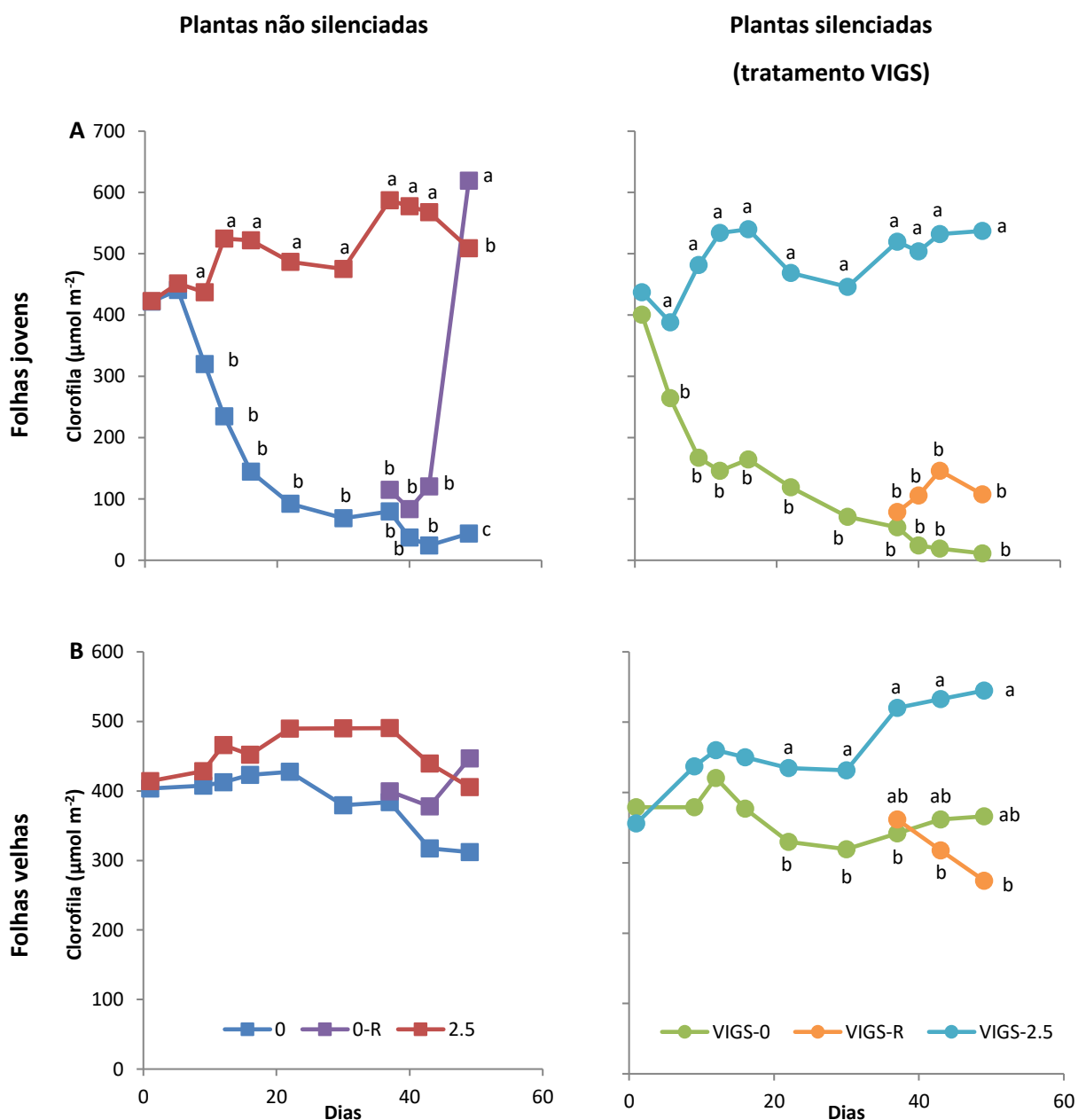


Figura 4.2. Valores de clorofila ($\mu\text{mol m}^{-2}$) em folhas jovens (A) e velhas (B) durante o período experimental. Tratamentos: **0** - plantas sem Fe na solução nutritiva; **2.5** - plantas com 2,5 μM de Fe na solução nutritiva; **VIGS-0** - plantas inoculadas com o vetor VIGS e sem Fe na solução nutritiva; **VIGS-2.5** plantas inoculadas com o vetor VIGS e com 2,5 μM de Fe na solução nutritiva; **0-R** - plantas de controlo que cresceram sem Fe e que foram recuperadas com a adição de 2,5 μM de Fe; **VIGS-R** - plantas contendo o vetor VIGS que cresceram sem Fe seguido uma reposição de 2,5 μM de Fe à solução nutritiva. Para cada data, as médias com letras diferentes são estatisticamente diferentes para $P < 0,05$ (teste de Duncan).

No final do ensaio (12 após o início da recuperação), as plantas **0-R** recuperaram completamente da deficiência de Fe (clorofila = $620 \pm 24 \mu\text{mol m}^{-2}$ em folhas jovens)

enquanto as plantas **VIGS-R** permaneceram clorótica (clorofila = $107 \pm 49 \mu\text{mol m}^{-2}$) tal como é possível observar nas **Figuras 4.2 e 4.3**.

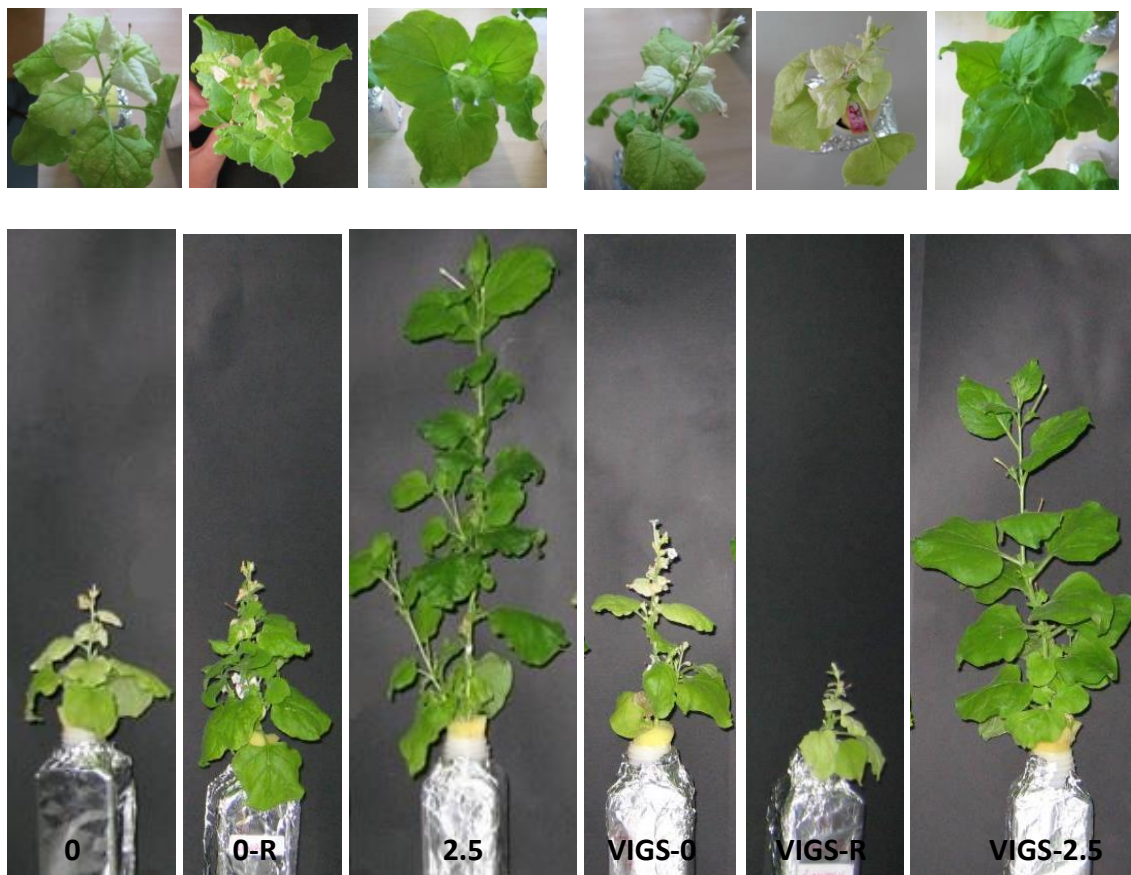


Figura 4.3. Aspeto geral de *Nicotiana benthamiana* no final do ensaio. Tratamentos: **0** - plantas sem Fe na solução nutritiva; **2.5** - plantas com $2,5 \mu\text{M}$ de Fe na solução nutritiva; **VIGS-0** - plantas inoculadas com o vetor VIGS e sem Fe na solução nutritiva; **VIGS-2.5** plantas inoculadas com o vetor VIGS e com $2,5 \mu\text{M}$ de Fe na solução nutritiva; **0-R** - plantas de controlo que cresceram sem Fe e que foram recuperadas com a adição de $2,5 \mu\text{M}$ de Fe; **VIGS-R** - plantas inoculadas com o vetor VIGS que cresceram sem Fe seguido de uma reposição de $2,5 \mu\text{M}$ de Fe.

Após 20 dias privados de Fe, as folhas velhas das plantas **VIGS-0** apresentaram valores de clorofila mais baixos quando comparadas com as plantas do controlo **2.5** (**VIGS-0** = $329 \pm 32 \mu\text{mol m}^{-2}$; **2.5** = $489 \pm 88 \mu\text{mol m}^{-2}$). No final do ensaio, as plantas **0-R** recuperaram para valores de clorofila semelhantes aos das plantas **2.5**, contrariamente às plantas **VIGS-R** que, nesse intervalo de tempo, não conseguiram atingir esses valores.

No dia 37, as plantas que cresceram sem Fe (**0** e **VIGS-0**) emitiram menos folhas do que as plantas **2.5** (**Figura 4.4**). No entanto, após a fase da recuperação, as plantas **0-R** emitiram mais folhas em número equivalente ao das plantas controle (**2.5**). Contrariamente, as plantas **VIGS-R** apresentaram menor número de folhas do que **2.5** plantas no final do ensaio.

As plantas que cresceram com Fe apresentaram maior altura da parte aérea em comparação com plantas que cresceram sem Fe na solução nutritiva (**Figura 4.4**). Relativamente aos tratamentos de recuperação (**0-R** e **VIGS-R**) a altura da parte aérea foi significativamente reduzida e não atingiu os valores das plantas que cresceram sempre com quantidades suficientes de Fe.

As medições da atividade da QFR foram realizadas em duas datas, antes da recuperação da deficiência de Fe e no final do ensaio. As determinações foram realizadas em ápices radiculares, em discos foliares de folhas velhas e de folhas jovens usando pelo menos três repetições de cada planta de cada uma das modalidades. No geral, registou-se uma maior atividade da QFR nos ápices radiculares comparativamente à das folhas (**Tabela 4.1**).

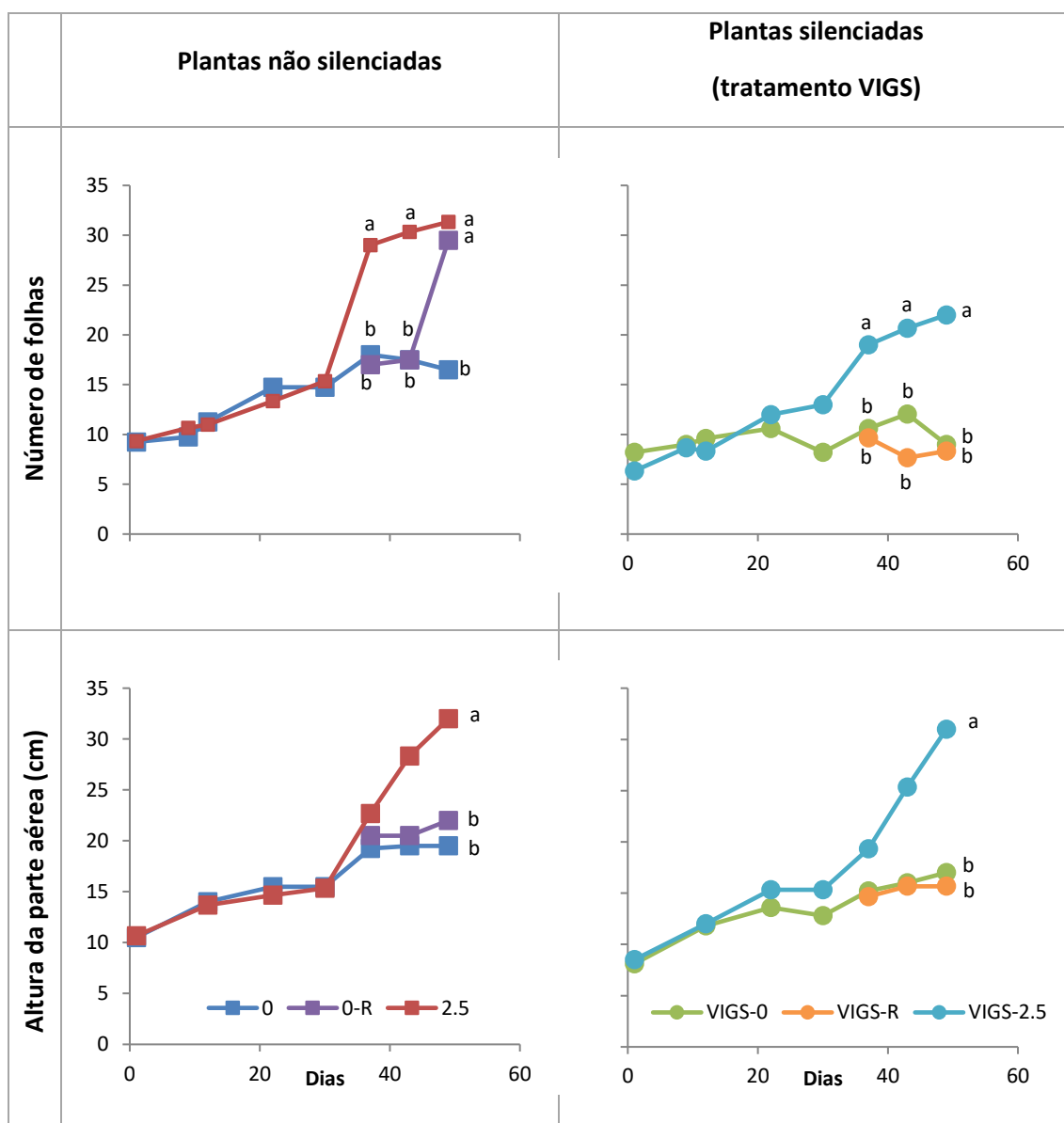


Figure 4.4. Número de folhas e altura da parte aérea (em cm) para os diferentes tratamentos ao longo do ensaio. Tratamentos: **0** - plantas sem Fe na solução nutritiva; **2.5** - plantas com 2,5 μM de Fe na solução nutritiva; **VIGS-0** - plantas inoculadas com o vetor VIGS e sem Fe na solução nutritiva; **VIGS-2.5** - plantas inoculadas com o vetor VIGS e com 2,5 μM de Fe na solução nutritiva; **0-R** - plantas de controlo que cresceram sem Fe e que foram recuperadas pela adição de 2,5 μM de Fe; **VIGS-R** - plantas contendo o vetor VIGS que cresceram sem Fe seguido de uma reposição de 2,5 μM de Fe à solução nutritiva. Para cada data, as médias com letras diferentes são estatisticamente diferentes para $P < 0,05$ (teste de Duncan).

Tabela 4.1. Atividade da QFR ($\text{nmol Fe (II) min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{PF}$; $n = 9$) e expressão relativa da FRO1 ($n = 3$) para os diferentes tratamentos no final do ensaio. Os valores de Fe foram obtidos numa amostra compósita de cada tipo de órgão. A partição de Fe (%) foi calculada em relação ao conteúdo total da folha. Tratamentos: **0** - plantas sem Fe na solução nutritiva; **2.5** - plantas com $2,5 \mu\text{M}$ de Fe na solução nutritiva; **VIGS-0** - plantas inoculadas com o vetor VIGS e sem Fe na solução nutritiva; **VIGS-2.5** - plantas inoculadas com o vetor VIGS e com $2,5 \mu\text{M}$ de Fe na solução nutritiva; **0-R** - plantas de controlo que cresceram sem Fe e que foram recuperadas com a adição de $2,5 \mu\text{M}$ de Fe; **VIGS-R** - plantas contendo o vetor VIGS que cresceram sem Fe seguido uma reposição de $2,5 \mu\text{M}$ de Fe à solução nutritiva. Os valores são apresentados como média \pm erro padrão. Para cada parâmetro, médias com letras diferentes indicam diferenças significativas para $P < 0,05$ (teste Duncan).

	0	0-R	2.5	VIGS-0	VIGS-R	VIGS-2.5
Raizes						
FRO1	$35,3 \pm 22,9$ a	$4,6 \pm 2,8$ b	$1,8 \pm 1,2$ b	$0,8 \pm 0,3$ b	$0,4 \pm 0,1$ b	$3,3 \pm 2,0$ b
QFR	$69,3 \pm 19,8$ a	$11,7 \pm 1,6$ b	$7,4 \pm 1,8$ b	$14,2 \pm 5,0$ b	$2,2 \pm 0,3$ b	$7,2 \pm 1,8$ b
Folhas velhas						
FRO1	$0,6 \pm 0,3$ a	$0,1 \pm 0,0$ a	$0,5 \pm 0,3$ a	$0,1 \pm 0,0$ a	$0,7 \pm 0,4$ a	$0,3 \pm 0,2$ a
QFR	$5,3 \pm 2,3$ a	$1,9 \pm 0,5$ ab	$3,4 \pm 0,2$ ab	$1,1 \pm 0,1$ b	$4,4 \pm 1,0$ ab	$2,2 \pm 0,6$ ab
<i>Fe</i> (μg)	399	1211	2030	139	653	1091
<i>Fe</i> (%)	79	93	87	47	89	72
Folhas jovens						
FRO1	$21,7 \pm 1,6$ a	$0,4 \pm 0,2$ b	$0,9 \pm 0,1$ b	$9,4 \pm 3,9$ ab	$11,7 \pm 5,6$ ab	$0,9 \pm 0,0$ b
QFR	$1,4 \pm 0,4$ b	$2,2 \pm 0,5$ b	$1,1 \pm 0,1$ b	$1,1 \pm 0,0$ b	$1,1 \pm 0,3$ b	$5,6 \pm 2,1$ a
<i>Fe</i> (μg)	105	98	301	154	80	418
<i>Fe</i> (%)	21	7	13	53	11	28

No final do ensaio, as plantas sem Fe (**0**) apresentaram maior atividade radicular da QFR (69 ± 19 $\text{nmol de Fe (II) min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{PF}$), comparativamente aos outros tratamentos que apresentaram valores semelhantes entre si. As plantas recuperadas (**0-R**) diminuíram a atividade radicular da QFR atingindo valores equivalentes às plantas que cresceram sempre em condições suficientes de Fe (plantas **2.5**). As plantas inoculadas com o vetor VIGS (**VIGS-0**; **VIGS-R** e **VIGS-2.5**) mantiveram uma baixa atividade radicular da QFR, independentemente da concentração de Fe disponível na solução nutritiva. No que diz respeito às folhas velhas, a maior atividade da QFR foi registada nas plantas sem Fe (**0**) e a menor nas plantas **VIGS-0**. Quanto às folhas jovens, as plantas **VIGS-2.5**

apresentaram atividade da QFR significativamente superior à observada nas folhas jovens das restantes modalidades.

Relativamente à expressão do gene FRO1, de uma maneira geral as raízes apresentaram a maior expressão comparativamente às folhas (**Tabela 4.1**). As plantas **0** apresentaram valores significativamente superiores de expressão comparativamente aos restantes tratamentos. Nas plantas **VIGS-0** a expressão do gene foi significativamente inferior comparativamente às plantas **0**.

Não se observaram diferenças entre as plantas inoculadas com o vetor VIGS e plantas controlo **2.5**. Nas folhas jovens, plantas sem Fe apresentaram maiores valores de expressão em comparação com plantas de **0-R**, **2.5** e **VIGS-2.5**. A expressão do gene foi semelhante em todos os tratamentos nas folhas velhas.

O Fe acumulou-se principalmente nas folhas velhas de todos os tratamentos conforme observado pelos valores de partição do Fe (**Tabela 4.1**). Em plantas inoculadas com o vetor VIGS, o teor total de Fe nas folhas foi quase metade comparativamente ao das plantas controlo. Nas folhas velhas, o **VIGS-0** apresentou o menor teor de Fe, e nas folhas jovens o teor inferior de Fe foi registado nas plantas sem Fe (**0**).

Após o período de recuperação, o Fe foi principalmente transportado para folhas velhas em ambos os tratamentos (**0-R** e **VIGS-R**), no entanto, as plantas **0-R** duplicaram a quantidade de Fe acumulada em comparação com as plantas **VIGS-R**.

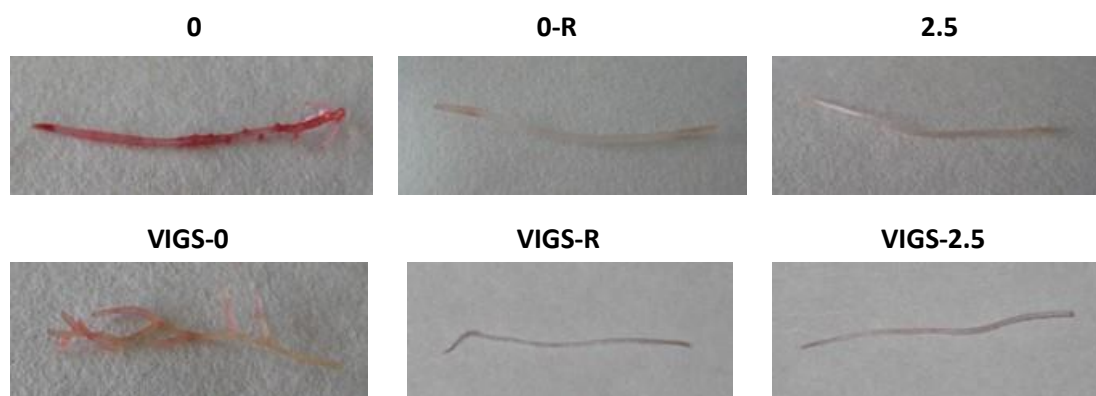


Figura 4.5. Aspetto geral dos ápices radiculares (2 cm de comprimento) dos diferentes tratamentos após a determinação da atividade da QFR no final do ensaio. A coloração e a intensidade do rosa dos ápices radiculares indicam o local e a atividade da QFR. Tratamentos: **0** - plantas sem Fe na solução nutritiva; **2.5** - plantas com 2,5 μM de Fe na solução nutritiva; **VIGS-0** - plantas inoculadas com o vetor VIGS e sem Fe na solução nutritiva; **VIGS-2.5** plantas inoculadas com o vetor VIGS e com 2,5 μM de Fe na solução nutritiva; **0-R** - plantas de controlo que cresceram sem Fe e que foram recuperadas com a adição de 2,5 μM de Fe; **VIGS-R** - plantas contendo o vetor VIGS que cresceram sem Fe seguido uma reposição de 2,5 μM de Fe à solução nutritiva

As plantas **VIGS-0** e as plantas sem Fe (**0**) aumentaram a formação de raízes secundárias, no entanto apresentaram uma morfologia diferente. Nas plantas **0** registaram-se ápices com maior dilatação com zonas subapicais pequenas e de coloração rosa intensificada (após a realização da determinação da atividade enzimática da QFR). Relativamente às plantas **VIGS-0** a dilatação foi menor e houve um aumento de emissão de ápices secundários com morfologia mais fina e mais alongada (**Figura 4.5**).

4.3. Ensaio 2 – *Lycopersicon esculentum*

4.3.1 Delineamento experimental

As plantas cresceram durante um período de aclimação em solução nutritiva com uma concentração 0,5 μM de Fe. Posteriormente foram divididas em três tratamentos (**Figura 4.6**): controlo (plantas sem agroinfiltração, **0.5**); controlo do vetor (plantas com agroinfiltração do TRV-GFP, **GFP-0.5**) e por último, plantas com o gene da FRO1 silenciado (plantas com agroinfiltração com o vetor VIGS, **VIGS-0.5**). Esta data correspondeu ao primeiro dia de ensaio.

Após 26 dias as plantas **0.5** e **GFP-0.5** não apresentaram sintomas de deficiência de Fe enquanto as plantas **VIGS-0.5** exibiram menor concentração de clorofila e apresentaram sintomas de deficiência de Fe. Nesta fase, as plantas de cada tratamento foram divididas em três grupos (**Figura 4.6**): i) o primeiro continuou a crescer em 0,5 μM de Fe (correspondendo aos tratamentos: **0.5**; **GFP-0.5** e **VIGS-0.5**); ii) ao segundo foi retirado o Fe da solução nutritiva, passando estas plantas a crescerem sem Fe (correspondendo aos tratamentos: **0**; **GFP-0** e **VIGS-0**) e, iii) ao terceiro, foi adicionado 10 μM de Fe (correspondendo aos tratamentos **10**; **GFP-10** e **VIGS-10**).

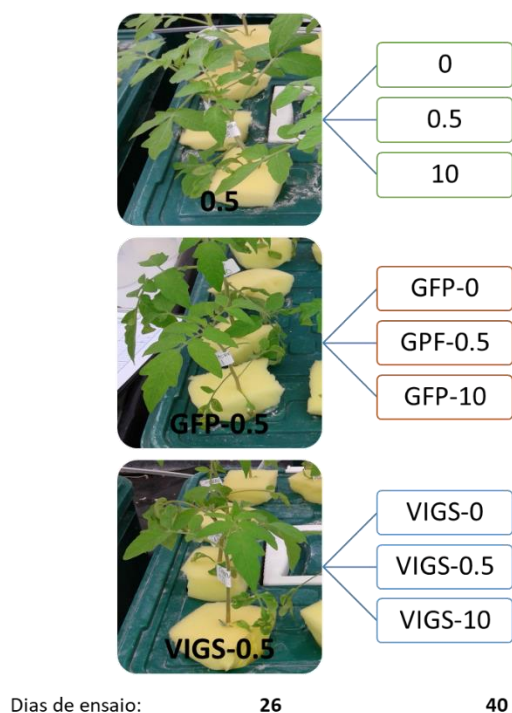


Figura 4.6. Delineamento experimental e respetivos dias após a transferência para solução nutritiva.

4.3.2 Resultados

As leituras de clorofila foram estimadas em folhas jovens (apicais) e em folhas velhas (basais). Para cada folha, foram registradas pelo menos duas leituras de SPAD, para obter um grau representativo da clorose e a média dos dois valores foi registrado como valor final para cada folha. As leituras foram posteriormente convertidas em concentração total de clorofila ($\mu\text{mol m}^{-2}$) usando a equação de calibração para o *Lycopersicum esculentum* (Capítulo 2 - **Tabela 2.2**). Ao longo do ensaio as leituras foram realizadas pelo menos três vezes por semana. Na **Figura 4.7A** está representada o teor de clorofila na primeira fase do ensaio com plantas dos três tratamentos (**0.5**, **GFP-0.5** e **VIGS-0,5**) que cresceram em $0,5 \mu\text{M}$ de Fe. As **Figuras 4.7B, C e D** representam o teor de clorofila na segunda fase do ensaio com plantas de cada modalidade que desenvolveram nas 3 diferentes concentrações de Fe (**0**, sem Fe na solução nutritiva, **0.5**, contendo $0,5 \mu\text{M}$ de Fe na solução nutritiva, **10** contendo $10 \mu\text{M}$ de Fe na solução nutritiva).

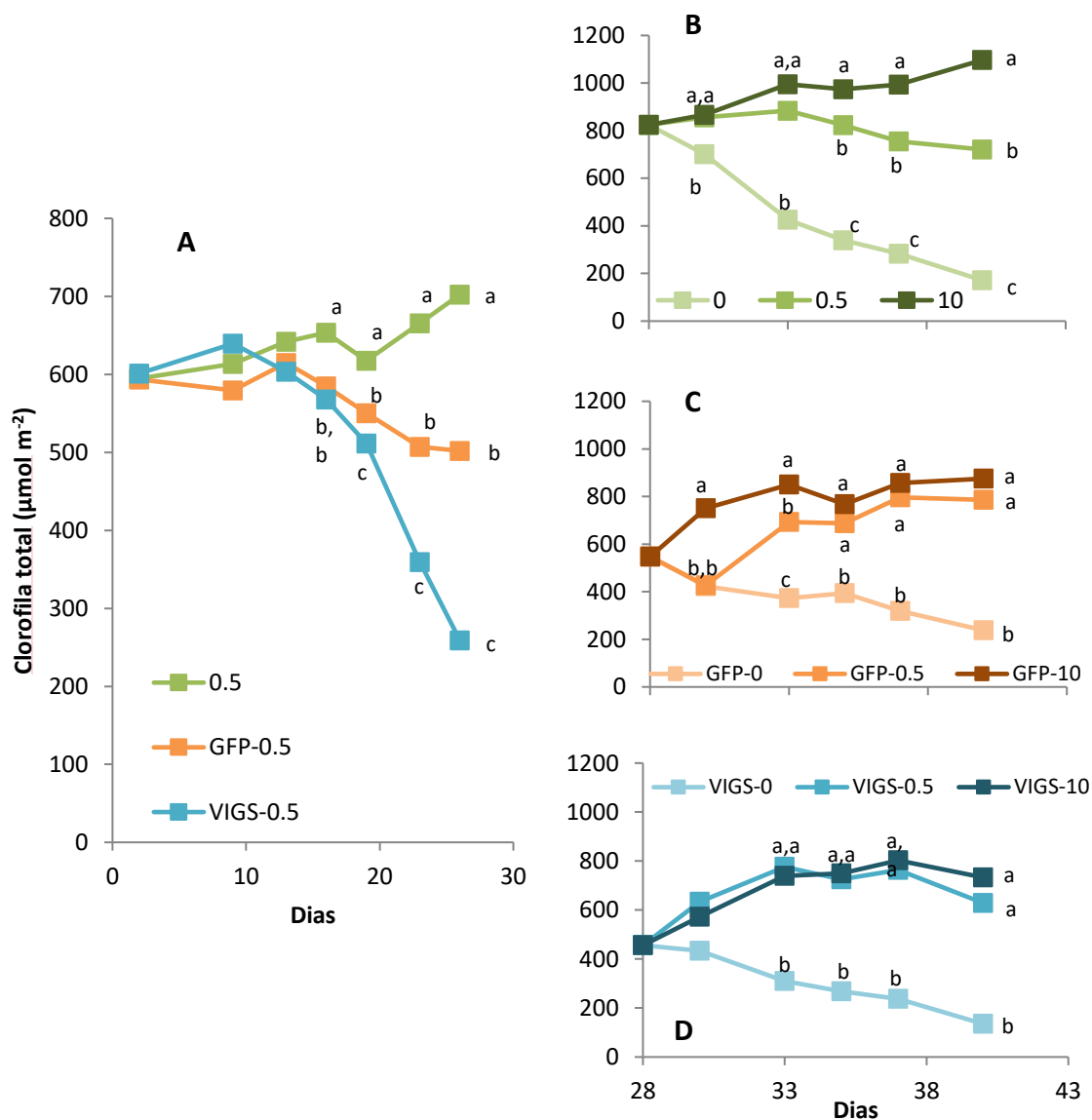


Figura 4.7. Valores médios de clorofila ($\mu\text{mol m}^{-2}$) nas folhas jovens para os diferentes tratamentos durante o período experimental. A: Plantas da primeira fase crescendo com $0.5 \mu\text{M}$ de Fe na solução nutritiva (**0.5**; **GFP-0.5** e **VIGS-0.5**). B: Plantas de controle na segunda fase do ensaio que crescem em 0 ; 0.5 e $10 \mu\text{M}$ de Fe. C: Plantas de controle do vetor que expressam a GFP na segunda fase do ensaio que crescem em 0 ; 0.5 e $10 \mu\text{M}$ de Fe, respectivamente, **GFP-0**; **GFP-0.5** e **GFP-10**. D: Plantas da segunda fase inoculadas com o vetor VIGS que cresceram em 0 ; 0.5 e $10 \mu\text{M}$ de Fe respectivamente, **VIGS-0**, **VIGS-0.5** e **VIGS-10**. Para cada data, letras diferentes são estatisticamente diferentes em $P < 0,05$ (Teste Duncan; $30 \geq n \leq 5$).

Nas plantas do controle **0.5** os valores de clorofila variaram entre 595 e $702 \mu\text{mol m}^{-2}$ durante a primeira fase do ensaio. A modalidade **GFP-0.5** apresentou uma ligeira diminuição nos valores de clorofila, mas sem revelar sintomas de deficiência de Fe. No

dia 26 apresentou $502 \pm 28 \mu\text{mol m}^{-2}$ de clorofila total nas folhas jovens. Vinte dias após a agroinfiltração do vetor VIGS, as plantas do tratamento **VIGS-0.5** apresentaram valores de clorofila significativamente inferiores aos controlos e mantiveram essa tendência ao longo da primeira fase. No fim da primeira fase (dia 26), ficou muito claro que as plantas inoculadas com o vetor VIGS (**VIGS-0.5**) apresentaram valores de clorofila significativamente inferiores ($259 \pm 16 \mu\text{mol m}^{-2}$) em comparação com as plantas **0.5** ($702 \pm 19 \mu\text{mol m}^{-2}$) e com as plantas **GFP-0.5** que estabilizaram os valores de clorofila em $502 \pm 28 \mu\text{mol m}^{-2}$.

A **Figura 4.8** mostra o aspeto geral das plantas dos 3 tratamentos que crescem em $0,5 \mu\text{M}$ de Fe na solução nutritiva no final da primeira fase (dia 26). É visível que apenas as plantas inoculadas com o vetor VIGS (**VIGS-0.5**) desenvolveram sintomas típicos de deficiência de Fe nas folhas jovens.



Figura 4.8. Aspeto geral das plantas de tomateiro cv. 'Cherry' no final da primeira fase do ensaio (dia 26). Os sintomas de deficiência de Fe desenvolvem-se claramente em plantas **VIGS-0.5**. Não foram observadas sintomas em plantas de **0.5** ou plantas **GFP-0.5**.

No final da segunda fase do ensaio (Dia 40), em que as plantas cresceram em três concentrações diferentes de Fe na solução nutritiva, verificou-se que as plantas contendo o vetor VIGS apresentaram valores de clorofila significativamente mais baixos, independentemente da concentração de Fe na solução nutritiva e em comparação com as plantas de controlo e plantas de controlo do vetor. Embora nesta fase as plantas de **VIGS-0.5** e **VIGS-10** não apresentassem sintomas visíveis de deficiência de Fe, os valores de clorofila ($628 \pm 34 \mu\text{mol m}^{-2}$ e $733 \pm 29 \mu\text{mol m}^{-2}$, respetivamente) foram inferiores

comparativamente às plantas **0.5** e **10** ($721 \pm 39 \mu\text{mol m}^{-2}$ e $1097 \pm 60 \mu\text{mol m}^{-2}$, respetivamente). No final do ensaio as plantas **VIGS-0** registaram o menor teor de clorofila ($135 \pm 8 \mu\text{mol m}^{-2}$).

O número de folhas e a altura da parte aérea (em cm) foram avaliados ao longo do período experimental. Ao dia 26 não se registaram diferenças significativas entre as plantas **VIGS-0.5** e as plantas controlo (**0.5** e **GFP-0.5**). No final do ensaio as diferenças registadas no número de folhas (**Figura 4.9**) estiveram associadas ao nível de Fe, ou seja, conforme aumentou a disponibilidade de Fe, maior foi a emissão de folhas independentemente da presença ou não do vetor VIGS.

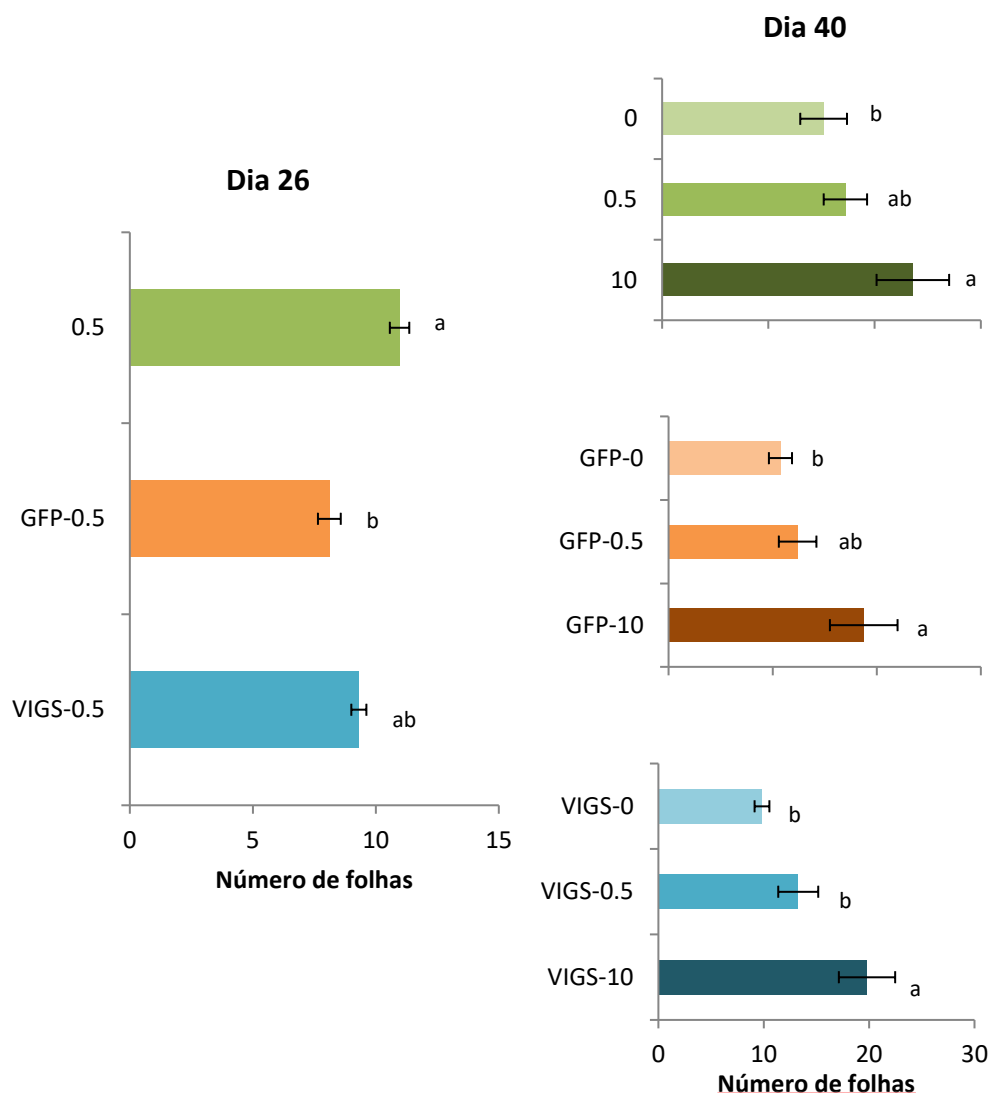


Figura 4.9. Número médio de folhas para os diferentes tratamentos durante o período experimental. Dia 26 - antes da imposição de tratamentos de Fe; Dia 40 - final do ensaio. Os tratamentos são: plantas de controlo: **0**; **0,5** e **10**; plantas de controlo do vetor **GFP-0**; **GFP-0,5** e **GFP-10**; plantas inoculados com o vetor VIGS **VIGS-0**; **VIGS-0.5** e **VIGS-10**. Para cada parâmetro, letras diferentes são estatisticamente diferentes para $P < 0,05$ (Teste Duncan; $30 \geq n \leq 5$).

No que diz respeito à altura da parte aérea da planta, observou-se uma diferença notável (**Figura 4.10**). O vetor de TRV pareceu causar uma redução na altura das plantas, visto que diferenças significativas foram observadas nas plantas GFP e VIGS independentemente da concentração de Fe na solução nutritiva. As diferenças foram observadas durante todo o ensaio.

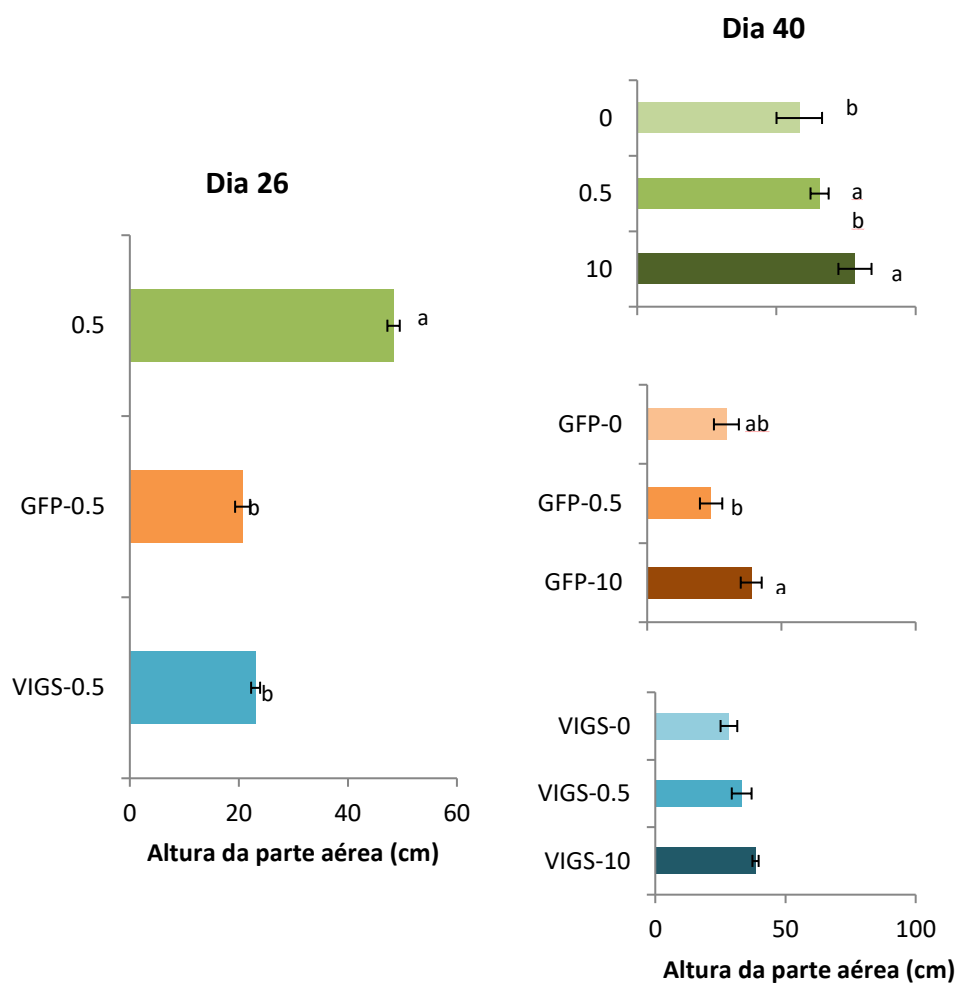


Figura 4.10. Altura média da parte aérea no Dia 26 (antes da imposição de tratamentos de Fe) e Dia 40 (final do ensaio) para os diferentes tratamentos durante o período experimental. Os tratamentos são: plantas de controlo: **0**; **0.5** e **10**; plantas de controlo do vetor **GFP-0**; **GFP-0.5** e **GFP-10**; plantas inoculados com o vetor VIGS **VIGS-0**; **VIGS-0.5** e **VIGS-10**. Para cada parâmetro, letras diferentes são estatisticamente diferentes para $P < 0,05$ (Teste Duncan; $30 \geq n \leq 5$).

No final do ensaio, as plantas de cada tratamento foram analisadas quanto à biomassa. Um conjunto de plantas ($n = 3$) foi selecionado aleatoriamente e as plantas de cada tratamento foram divididas em raízes, caule, folhas velhas e folhas jovens e determinados o peso fresco (PF) e peso seco (PS). Foi calculada a razão entre a parte radicular e a parte aérea (R/A) em termos de peso seco nas duas fases: dia 26 e no final do ensaio (dia 40).

A biomassa do final do ensaio está representada na **Tabela 4.2**. Em geral, a biomassa tendeu a ter maiores valores em plantas de controlo em comparação com os outros dois tratamentos (GFP e VIGS) independentemente da concentração de Fe na solução nutritiva. As plantas GFP e VIGS apresentaram biomassa significativamente menor no caule e nas folhas jovens comparativamente às plantas de controlo independentemente da concentração de Fe.

Tabela 4.2. Efeito dos tratamentos na partição da biomassa (em g de peso seco - PS) no final do ensaio. Os tratamentos são: plantas de controlo: **0**; **0.5** e **10**; plantas de controlo do vetor: **GFP-0**; **GFP-0.5** e **GFP-10**; plantas inoculados com o vetor VIGS: **VIGS-0**; **VIGS-0.5** e **VIGS-10**. Para cada material vegetal, as médias ($n \geq 3$) com letras diferentes são estatisticamente diferentes para $P < 0,05$ (Teste Duncan).

Tratamento	Raiz	Caule	Folhas velhas	Folhas jovens
0	0,70±0,10 a	2,30±0,65 a	1,57±0,67 ab	1,57±0,03 b
0.5	0,60±0,15 ab	2,43±0,47 a	1,93±0,72 ab	2,00±0,17 ab
10	0,77±0,24 a	2,57±0,56 a	2,27±1,01 a	2,17±0,37 a
GFP-0	0,09±0,01 d	0,77±0,15 b	0,30±0,12 b	0,27±0,07 c
GFP-0.5	0,13±0,03 cd	0,47±0,18 b	0,40±0,10 ab	0,33±0,13 c
GFP-10	0,53±0,24 abc	1,10±0,44 b	2,07±0,94 ab	0,73±0,30 c
VIGS-0	0,16±0,03 cd	0,70±0,10 b	0,43±0,03 ab	0,37±0,07 c
VIGS-0.5	0,09±0,02 d	0,67±0,19 b	0,37±0,13 ab	0,40±0,12 c
VIGS-10	0,21±0,10 bcd	0,67±0,17 b	0,43±0,12 ab	0,47±0,09 c

A razão entre o peso seco da parte radicular e parte aérea (**Figura 4.11**) determinada no dia 26 mostrou um valor significativamente superior em plantas contendo o vetor VIGS (**VIGS-0.5**) comparativamente aos tratamentos controlo (**0.5** e **GFP-0.5**). Isso indica um maior investimento na biomassa radicular em comparação com parte aérea.

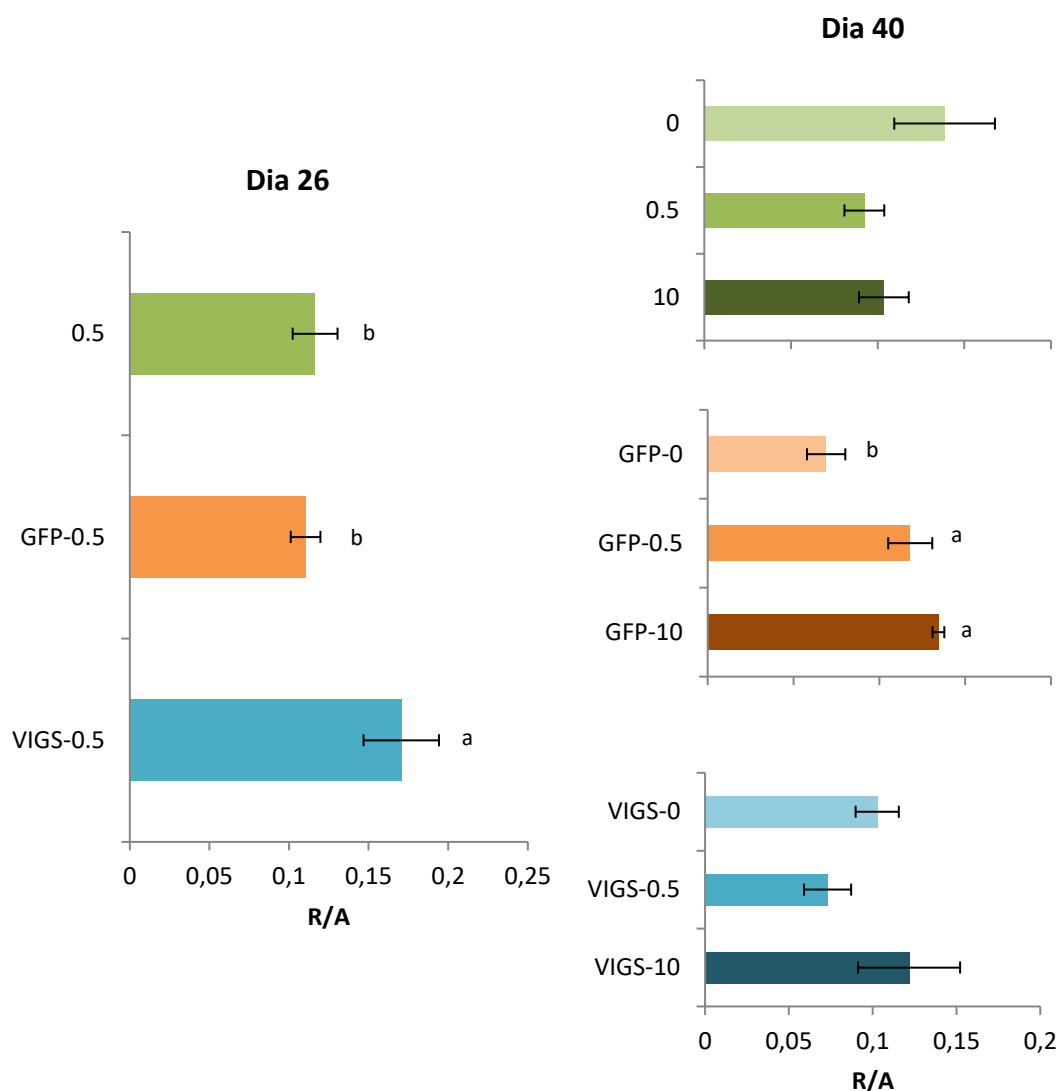


Figura 4.11. Razão entre a parte radicular e a parte aérea (R/A) calculada em função do peso seco (PS), nos dias 26 e 40. Os tratamentos são: plantas de controlo: **0**; **0.5** e **10**; plantas de controlo do vetor **GFP-0**; **GFP-0.5** e **GFP-10**; plantas inoculados com o vetor VIGS **VIGS-0**; **VIGS-0.5** e **VIGS-10**. Os valores são médias de $n \geq 3$. Colunas com letras diferentes indicam diferenças significativas para $P < 0,05$ (Teste Duncan).

Ao final do ensaio (Dia 40) praticamente não foram obtidas diferenças significativas entre os tratamentos.

A atividade da QFR foi medida em ápices radiculares (**Figura 4.12**) nas duas fases do ensaio, no dia 26 e no final do ensaio (Dia 40).

Na primeira fase (Dia 26), a atividade da QFR foi significativamente menor em plantas silenciadas (**VIGS-0.5**: 26 ± 2 nmol Fe(II) $\text{min}^{-1} \text{g}^{-1}$ PF) em comparação com plantas controle (**0.5**: 31 ± 1 nmol Fe(II) $\text{min}^{-1} \text{g}^{-1}$ PF). Não foram obtidas diferenças significativas entre ambos os controles, **0.5** e **GFP-0.5**.

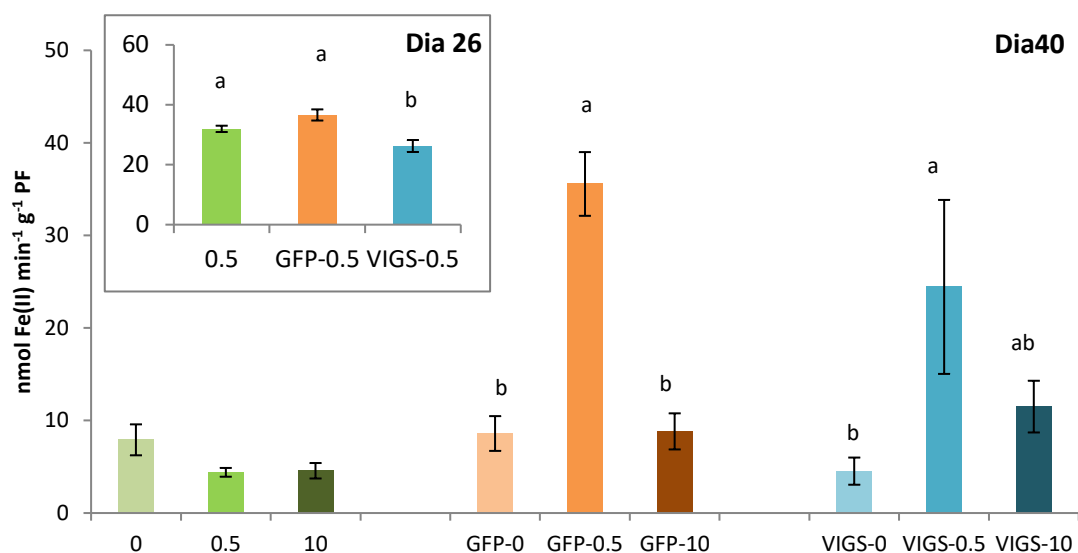


Figura 4.12. Atividade da QFR em ápices radiculares (nmol Fe (II) $\text{min}^{-1} \text{g}^{-1}$ PF) avaliada no dia 26 e no final do ensaio (Dia 40) para os diferentes tratamentos. Os tratamentos são: plantas de controle: **0**; **0.5** e **10**; plantas de controle do vetor **GFP-0**; **GFP-0.5** e **GFP-10**; plantas inoculados com o vetor VIGS **VIGS-0**; **VIGS-0.5** e **VIGS-10**. Os dados são médias de $n \geq 3$. Colunas com letras diferentes indicam diferenças significativas para $P < 0,05$ (Teste Duncan).

Em geral, no final do ensaio (Dia 40) a atividade da QFR foi reduzida em todos os tratamentos à exceção da **GFP-0.5** e do **VIGS-0.5** que continuaram a manter uma atividade semelhante ao dia 26 (35.6 ± 3.4 nmol de Fe(II) $\text{min}^{-1} \text{g}^{-1}$ PF e 24.4 ± 9.4 nmol Fe(II) $\text{min}^{-1} \text{g}^{-1}$ PF, respetivamente).

Para a quantificação da expressão relativa do mRNA do gene FRO1, avaliado no dia 26, foi extraído o RNA de ápices radiculares dos tratamentos **0.5**, **GFP-0.5** e **VIGS-0.5** (**Figura 4.13**). Para esta análise utilizou-se uma amostra compósita de três repetições biológicas para cada um dos tratamentos.

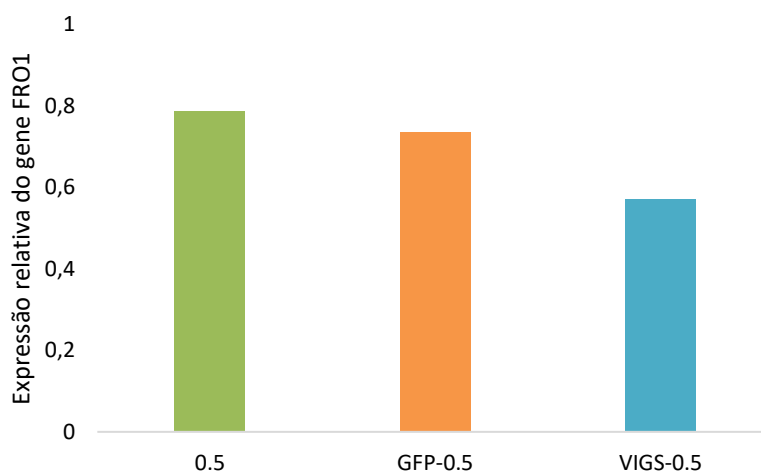


Figura 4.13. Expressão relativa do gene FRO1 em ápices radiculares para os diferentes tratamentos no dia 26. Os tratamentos são: plantas de controle: **0.5**; plantas de controle do vetor **GFP-0.5** e plantas VIGS, **VIGS-0.5**. Os dados são valores únicos obtidos a partir da análise de uma amostra composta de $n > 3$.

Nesta fase, as plantas **VIGS-0.5** apresentaram o valor de expressão do gene FRO1 mais baixo comparativamente aos controles **0.5** e **GFP-0.5** que apresentaram valores de expressão mais altos. Não foi possível demonstrar a existência de diferenças significativas após 40 dias (dados não apresentados).

4.4. Discussão

As diretrizes da homeostase de Fe, tais como o movimento, transportadores, armazenamento e partição em órgãos de plantas, têm sido áreas de investigação nos últimos anos. No entanto, ainda há uma necessidade de esclarecimento dos sinais-chave que desencadeiam o transporte a longa distância do Fe em plantas com deficiência de Fe. Este estudo teve como objetivo esclarecer algumas respostas metabólicas da deficiência de Fe estudando os efeitos do silenciamento do gene FRO1 em plantas de *Nicotiana benthamiana* e *Lycopersicon esculentum* aplicando a técnica VIGS. Esta técnica apresenta vantagens comparativamente ao silenciamento de genes recorrendo a plantas transgênicas (Senthil-Kumar e Mysore, 2011).

Em condições deficientes, a expressão de alguns genes pode ser induzida ou reprimida para garantir a homeostase do Fe (Mukherjee *et al.*, 2006; Vigani *et al.*, 2013). Lucena *et al.* (2006) propuseram um modelo integrativo em plantas para explicar o aumento de expressão de genes (*upregulation*) envolvidos na aquisição de Fe em resposta à deficiência de Fe. Este modelo tem por base um *crosstalk* entre sinais locais e os de longa distância, que se cruzam entre as folhas e as raízes e que podem ser hormonais (etileno, óxido nítrico) ou o próprio Fe no floema. Também numa experiência realizada com o mutante *irt1* de *Arabidopsis thaliana* (desprovido do transportador de Fe) a adição de Fe a nível radicular não levou ao alongamento dos ápices radiculares, no entanto quando o Fe foi adicionado às folhas as alterações radiculares ocorreram (Giehl *et al.*, 2012). Até à data não foram conhecidos estudos que clarifiquem a caracterização funcional do gene FRO1 em plantas de *Nicotiana benthamiana*. Vários estudos demonstraram alterações de expressão dos genes FRO, mas são necessários mais avanços na caracterização funcional (Enomoto *et al.*, 2007; Gonzalo *et al.*, 2011; Mukherjee *et al.*, 2006; Murgia *et al.*, 2011; Santos *et al.*, 2013; Sperotto *et al.*, 2010; Vigani *et al.*, 2013).

No ensaio com *Lycopersicon esculentum* duas semanas após a inoculação com o vetor TRV (correspondente ao tratamentos: **GRP-0.5** e **VIGS-0.5**) foi observado uma redução na altura da planta e uma diminuição geral da biomassa em comparação com o controlo, sugerindo uma leve sensibilidade ao vetor TRV (Wu *et al.*, 2011). Não foram observadas estas modificações no ensaio com *Nicotiana benthamiana*.

Ambas as espécies ensaiadas apresentam sensibilidade à deficiência de Fe e desenvolveram uma série de mudanças adaptativas que foram observadas neste ensaio, tais como, a redução da síntese de clorofila observada nas folhas jovens, alterações morfológicas a nível radicular e um declínio no crescimento geral (Abadía e Abadía, 1993; Graziano e Lamattina, 2007; He *et al.*, 2008).

Como resposta à deficiência de Fe, em plantas de *Nicotiana benthamiana*, ocorreu um aumento na atividade da QFR e de expressão do gene FRO1 nas raízes. Os sintomas descritos foram observados em plantas da estratégia I (dicotiledóneas e não gramíneas) já definidas por vários autores em outras culturas como pêssigo (El-Jendoubi *et al.*, 2014), beterraba-sacarina (López-Millán *et al.*, 2001), *citrus* (Pestana *et al.*, 2005) e morangueiro (Gama *et al.*, 2016). Este processo baseado na redução do Fe também foi

associado à indução de alterações morfológicas a nível radicular (Long *et al.*, 2010; McCluskey *et al.*, 2004; Pestana *et al.*, 2012a; Pestana *et al.*, 2001b). No entanto, nas plantas **VIGS-0**, essas alterações morfológicas são menos evidentes e associadas a uma menor expressão do gene FRO1 a nível radicular. A diminuição no teor de clorofila nas folhas jovens foi ligeiramente antecipada nas plantas **VIGS-0**, uma vez que foram impostos dois *stresses* simultâneos: ausência de Fe e silenciamento do gene. Uma vez que ocorreu o silenciamento do gene FRO1, a atividade da QFR radicular não foi estimulada e conseqüentemente ocorreu uma diminuição acentuada no teor total de Fe nas folhas. Estes resultados salientam a importância do gene FRO1 na codificação da enzima da QFR na movimentação Fe (II) na planta, especialmente na translocação do Fe entre as folhas velhas e as folhas jovens (Legay *et al.*, 2012). O gene FRO1 é fortemente regulado pela deficiência de Fe que foi observado pelo incremento na expressão do gene nas raízes e nas folhas jovens de plantas **0** de *Nicotiana benthamiana*. A indução de expressão do FRO1 como resposta à deficiência de Fe foi relatada em outras espécies, nomeadamente em *Prunus* (Gonzalo *et al.*, 2011), batata (Legay *et al.*, 2012) e ervilha (Waters *et al.*, 2002). Nestas plantas a expressão do FRO1 nas folhas velhas foi baixa independente da disponibilidade de Fe, possivelmente devido ao alto teor de Fe nestas folhas e à baixa mobilidade deste nutriente para outros órgãos da planta.

No ensaio com *Lycopersicon esculentum* as plantas controlo **0.5** e **GFP-0.5** não apresentaram sintomas aparentes de deficiência de Fe, no entanto o mesmo não foi aplicado às plantas com o gene silenciado (**VIGS-0.5**). Nestas plantas foram visíveis cloroses interveinais nas folhas jovens devido a um aparelho fotosintético ineficiente. Esta resposta apoia o fato de o gene FRO1 estar silenciado nessas plantas (Hiriart *et al.*, 2002; Pestana *et al.*, 2001a). Nas plantas silenciadas (**VIGS-0.5**) a diminuição da clorofila foi associada a uma diminuição da atividade da QFR radicular e a um valor de expressão do gene FRO1 inferior mostrando que a agroinfiltração com o vector VIGS obstruiu a redução do Fe(III) ao Fe(II) na superfície da raiz (He *et al.*, 2008; Jeong e Connolly, 2009; Li *et al.*, 2004; Mukherjee *et al.*, 2006).

Relativamente ao ensaio de recuperação em *Nicotiana benthamiana* após a adição de Fe à solução nutritiva, a recuperação dos sintomas foliares só foi observada em plantas **0-R** (plantas não-silenciadas cloróticas) que atingiram valores de clorofila superiores às

plantas **2.5**, que cresceram sempre em concentração de Fe não-limitante. Este facto sugere que o *stress* de Fe não causou danos permanentes no aparelho fotossintético devido ao rápido acesso de Fe via xilema às folhas jovens como observado na beterraba-sacarina (López-Millán *et al.*, 2001), morangueiro (Osório *et al.*, 2014) e pessegueiro (Fernández *et al.*, 2008). A nível radicular a atividade da QFR e a expressão do gene FRO1 foram reduzidas a valores semelhantes as plantas **2.5** associado à normalização da partição do Fe entre folhas jovens e velhas. Isso demonstra ainda uma recuperação da deficiência de Fe e uma desativação dos mecanismos envolvidos na aquisição de Fe em plantas de estratégia I. Nas plantas **VIGS-R**, a adição de Fe à solução nutritiva não levou a qualquer recuperação visível e as folhas jovens permaneceram cloróticas, a nível radicular a atividade da QFR manteve-se diminuída e a expressão relativa do gene FRO1 permaneceu baixa. Considerando esta resposta global, a absorção de Fe em plantas silenciadas foi insuficiente para mobilizar o Fe até às folhas jovens em desenvolvimento. Outros genes pertencentes à família FRO podem estar envolvidos na regulação e homeostase do Fe a nível da parte aérea, conforme foi observado pelo padrão da partição do Fe entre folhas velhas e folhas jovens.

Na segunda fase do ensaio com *Lycopersicon esculentum* o efeito silenciamento do gene FRO1 pareceu diminuir drasticamente. Isto foi observado em plantas **VIGS-0.5** que inicialmente exibiram sintomas de deficiência de Fe, mas aparentemente recuperaram sem qualquer modificação na concentração de Fe na solução nutritiva. É possível considerar que a infecção sistêmica sintomática foi seguida pelo aparecimento de folhas jovens assintomáticas que revelam recuperação da deficiência de Fe. Isso pode ser devido a menores títulos de infecção pelo vírus (Ghoshal e Sanfaçon, 2015), mas não pode ser rejeitada a possibilidade de ter havido a indução de um mecanismo de resposta a nível da planta. Por exemplo, a concentração de proteína residual pode ter sido suficiente para realizar sua própria função sem alterações fenotípicas que levem a um ajuste em vez de danos permanentes no aparelho fotossintético, visto que essas plantas tinham uma fonte de Fe na solução nutritiva (Gama *et al.*, 2016; López-Millán *et al.*, 2001; Pestana *et al.*, 2012a; Velásquez *et al.*, 2009). Também foi descrito, dependendo da espécie, o silenciamento efetivado pelos vetores VIGS tende a diminuir após 1 mês conduzindo a uma recuperação do silenciamento nas plantas devido ao seu efeito

transitório e nestes casos a recuperação dos sintomas pode ocorrer (Ratcliff *et al.*, 2001; Ryu *et al.*, 2004). A atividade da QFR a nível radicular registrada em plantas controle no final do ensaio mostrou que as plantas que crescem na ausência de Fe (**0**) apresentaram um aumento da atividade em comparação com as plantas que crescem em 0,5 e 10 μM de Fe na solução nutritiva (**0.5** e **10**). Comparando esses resultados com os obtidos nas plantas silenciadas, o tratamento **VIGS-0.5** mostrou um incremento na atividade da QFR muito maior em comparação com **VIGS-0** e **VIGS-10**, isto pode ser devido a um requisito específico de necessidade de existir uma pequena quantidade de Fe para aumentar a atividade da QFR, sugerindo que, em plantas silenciadas, o nível limiar de Fe na solução de nutrientes que aumenta a atividade de QFR pode ser superior ao das plantas de controle (Zouari *et al.*, 2001). No final do ensaio as plantas **VIGS-0.5** apresentaram valores mais baixos de clorofila nas folhas jovens em comparação com o controle de **0.5**. Embora não tenham sido observados sintomas visuais de deficiência de Fe, os valores de clorofila foram quase no limiar para a deficiência de Fe (aproximadamente 600 $\mu\text{mol m}^{-2}$) e tendo em conta que a expressão da atividade da QFR pode estar sujeita tanto a sinais da parte aérea como da parte radicular, é possível que, nas plantas silenciadas, o aumento da atividade se deveu a valores mais baixos de clorofila logo ocorreu um sinal sistêmico assumido pelas folhas e transmitido para as raízes.

4.5. Conclusão

Em *Nicotiana benthamiana*, a atividade da QFR e a expressão do gene FRO1 diminuíram em plantas inoculadas com o vetor VIGS indicando o efeito do silenciamento do gene FRO1. Após a adição de Fe na solução nutritiva, as plantas silenciadas não recuperaram da deficiência, apontando desta forma a função fortemente reprimida do gene FRO1, pois essas plantas não conseguiram retomar o metabolismo na síntese de clorofila, no crescimento vegetativo e na ativação da QFR.

Relativamente ao *Lycopersicon esculentum* o efeito do silenciamento foi mais transitório e apenas foi observado na primeira fase do ensaio. No entanto, as plantas com o gene FRO1 silenciado diminuíram a síntese de clorofila, reduziram a atividade da

QFR a nível radicular e, conseqüentemente, apresentaram menor expressão de FRO1 relativa.

As duas espécies usadas nestes ensaios são plantas modelo essenciais para o estudo da sinalização molecular e dos mecanismos de absorção de Fe nas plantas da estratégia I e para estudos de melhoramento na produção de culturas em solos deficientes em Fe. Esses resultados demonstraram como a técnica do VIGS foi eficaz na análise funcional do gene FRO1 associada à deficiência de Fe. Também foi demonstrado que o vetor VIGS construído com base no gene FRO1 do *Lycopersicon esculentum* produziu efeito de silenciamento na *Nicotiana Benthamiana*. O gene FRO1 não está sequenciado na *Nicotiana Benthamiana* mas ambas as espécies pertencem à mesma família logo havendo sequências de nucleótidos conservadas no gene.

4.6. Agradecimentos

Este estudo foi financiado pelo Projeto Nacional da FCT - Fundação para Ciência e Tecnologia: PTDC/AGR-PRO/3861/2012. A F. Gama agradece a FCT a bolsa de doutoramento: SFRH/BD/89521/2012.

CAPÍTULO 5

A INDUÇÃO DE DEFICIÊNCIA DE FERRO NO PORTA-ENXERTO *PONCIRUS TRIFOLIATA* E O DESEMPENHO FISIOLÓGICO APÓS O TRANSPLANTE PARA O SOLO

Parte deste capítulo encontra-se publicado:

Gama, F.; Saavedra, T.; Díaz, I.; Campillo, M. C.; Varennes, A.; Duarte, A.; Pestana, A.; Correia, P. J. (2015) Fe deficiency induction in *Poncirus trifoliata* rootstock growing in nutrient solution changes its performance after transplant to soil. *Scientia Horticulturae*. 182:102-109. Doi: 10.1016/j.scienta.2014.11.003

5.1. Resumo

A ausência de Fe na solução nutritiva induziu diversas adaptações fisiológicas e alterações morfológicas nas raízes no *Poncirus trifoliata*, um porta-enxerto de citrinos, modificando conseqüentemente o seu estado nutricional. Neste trabalho pretendeu-se avaliar se as alterações observadas induzem a tolerância ao *stress* quando transplantadas para solos calcários.

Na primeira fase (fase I), as plantas de *Poncirus trifoliata* cresceram em solução nutritiva de Hoagland com 120 µM de Fe (tratamento **Fe120**) ou na ausência de Fe (tratamento **Fe0**). No final da fase I (87 dias), as plantas que cresceram na ausência de Fe apresentaram menor teor de clorofila nas folhas jovens, engrossamento dos ápices radiculares e aumento da atividade da enzima da QFR. Nestas plantas, cloróticas, a teor total de Fe foi menor, comparativamente com plantas controlo, tendo, no entanto, acumulado mais Cu e Zn. Em contraste, a razão entre a parte radicular e a parte aérea (em termos de PS) e as quantidades de macronutrientes não foram afetadas pela deficiência de Fe.

Na fase II, as plantas provenientes dos dois tratamentos estabelecido em solução nutritiva (com Fe - **Fe120** ou sem Fe - **Fe0**) dividiram-se em dois grupos, sendo transplantadas para vasos contendo dois tipos de solo (com calcário - C ou sem calcário - nC) o que resultou numa combinação de quatro tratamentos: **Fe0nC**, **Fe120nC**, **Fe0C** e **Fe120C**.

No final do ensaio verificou-se que o equilíbrio nutricional global das plantas foi negativamente afetado pela presença de calcário, independentemente dos níveis de Fe com que cresceram em solução nutritiva (**Fe0** ou **Fe120**). A capacidade destas plantas alterarem o equilíbrio nutricional, em particular do Cu, como uma resposta à deficiência de Fe foi mantida mesmo nas plantas que cresceram no solo sem calcário. Além disso, a indução prévia de adaptações fisiológicas e morfológicas à ausência de Fe, atenuou os sintomas de clorose férrica causada pelos carbonatos existentes no solo. Estes resultados podem indicar que os porta-enxertos pré-submetidos a condições de *stress* nutricional, adquirem uma sinalização interna ou memória do *stress*, que poderá complementar a adaptabilidade e tolerância geneticamente pré-estabelecida.

5.2. Delineamento experimental

Com o objetivo de estudar o efeito dos mecanismos de resposta induzidos pela deficiência de Fe na adaptabilidade ao transplante para solos, nomeadamente calcários, foi efetuado um ensaio com porta-enxertos de citrinos, *Poncirus trifoliata*, dividido em duas fases. Numa primeira fase, em solução nutritiva (fase I, **Figura 5.1**) induziram-se as alterações fisiológicas nas plantas que cresceram sem Fe (87 dias) e numa segunda fase, as plantas provenientes da solução nutritiva foram transplantadas para solo (fase II, **Figura 5.1**), decorrendo esta fase em vaso durante 353 dias. O *Poncirus trifoliata* é um porta-enxerto de folha caduca, as folhas foram gradualmente caindo durante o inverno e a rebentação de primavera começou no final de março (253 dias após o transplante). No início de abril, uma clara diferenciação poderia ser feita entre as folhas jovens apicais e as folhas velhas basais de acordo com sua posição no caule. O ensaio incluindo as duas fases de ensaio decorreu durante 442 dias.

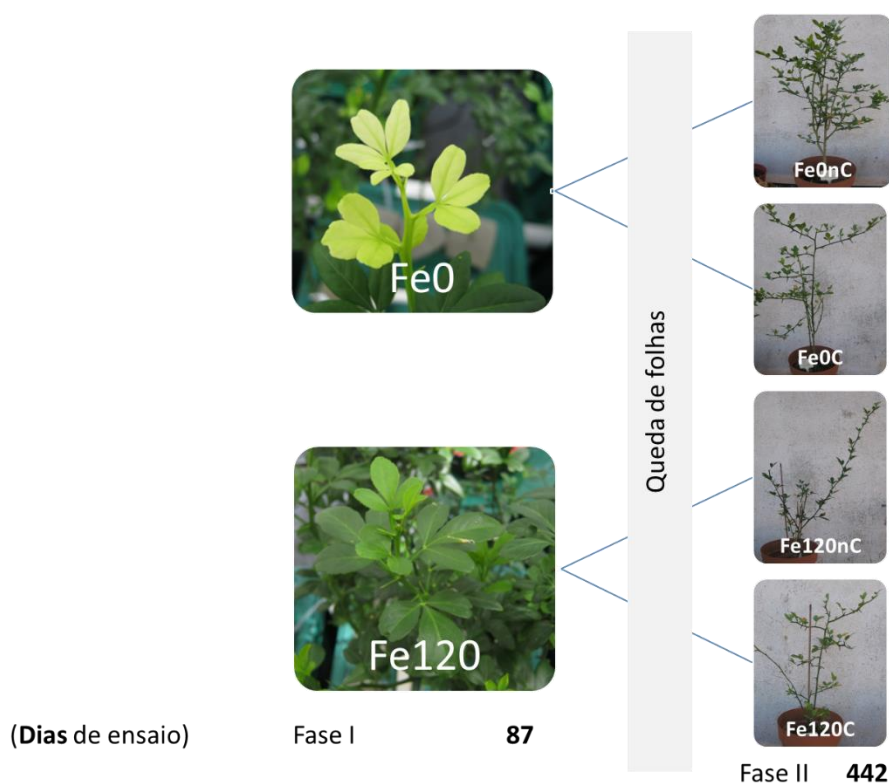


Figura 5.1. Esquema do delineamento experimental com destaque para as duas fases do ensaio e duração de cada uma. Fase I – ensaio em solução nutritiva, Fase II – ensaio em vaso com solo não calcário (nC) e solo calcário (C). Os tratamentos são: **Fe0**, plantas que cresceram em solução nutritiva sem Fe; **Fe120**, plantas que cresceram em solução nutritiva com 120 μM de Fe; **Fe0nC**, plantas que cresceram 87 dias em solução nutritiva sem Fe e posteriormente transplantadas para substrato sem calcário; **Fe0C**, plantas que cresceram 87 dias em solução nutritiva sem Fe e posteriormente transplantadas para substrato com calcário; **Fe120nC**, plantas que cresceram 87 dias em solução nutritiva com 120 μM de Fe e posteriormente transplantadas para substrato sem calcário; **Fe120C**, plantas que cresceram 87 dias em solução nutritiva com 120 μM de Fe e posteriormente transplantadas para substrato com calcário. Dia final do ensaio: 442.

5.2.1. Fase I – Ensaio em solução nutritiva

Plantas do porta-enxerto de citrinos, *Poncirus trifoliata* (L.) Raf) foram cultivadas em solução nutritiva completa de Hoagland com dois níveis de Fe: sem Fe (**Fe0**) ou com 120 μM de Fe na forma FeEDDHA (**Fe120**). O ensaio decorreu numa estufa de vidro e para cada tratamento de Fe utilizaram-se 15 plantas, divididas em contentores de 20 L de capacidade com distribuição aleatória. Esta fase decorreu durante 87 dias (**Figura 5.1**), findos os quais se procedeu ao transplante para vaso.

5.2.2. Fase II – Solo calcário

A segunda fase deste ensaio iniciou-se com o transplante das plantas em hidroponia para vasos com substrato. Nesta data, final de julho, as plantas apresentavam cerca de 36 ± 3 cm de altura. Selecionaram-se dois solos característicos da região do Algarve, com e sem calcário. Estabeleceram-se quatro tratamentos em vaso, resultantes da combinação de dois níveis de Fe (0 e 120) com dois tipos de solo (com e sem calcário). A cada tipo de solo foi adicionado vermiculite e matéria orgânica (MO) na proporção de 2:1:1 para melhorar as propriedades de arejamento e drenagem. Nesta altura foram selecionadas aleatoriamente três amostras para a caracterização dos dois substratos. Para garantir as quantidades necessárias de nutrientes ao longo do período experimental da fase II, foi adicionado um fertilizante NPK ao substrato com as seguintes unidades totais por vaso (UF, unidades de fertilizante): N: 3,5 UF; P: 10,5 UF; K: 10,5 UF. Os tratamentos **Fe0nC** e **Fe120nC** corresponderam a plantas que cresceram sem Fe ou com 120 μM de Fe na fase I e posteriormente foram colocadas no solo sem calcário (nC) e aos tratamentos **Fe0C** e **Fe120C**, a plantas que cresceram sem Fe ou com 120 μM de Fe na fase I e que depois foram transplantadas para o solo com calcário (C) na fase II (**Figura 5.1**). Foram utilizados vasos de 21 cm de diâmetro enchidos com 4600 g de cada substrato e foram utilizadas cinco plantas por cada tratamento. Por sua vez, os vasos foram colocados ao acaso, no exterior com sombreamento e com sistema de rega automático de gota a gota com uma taxa de 0,4 L por vaso (**Figura 5.2**). O pH da água da rega foi de 6,5 e a CE de 0,3 dS m^{-1} .



Figura 5.2. Aspeto geral dos porta-enxertos de *Poncirus trifoliata* durante a fase II.

A clorofila foi avaliada ao longo do ensaio. A altura, o número de folhas, a biomassa e a razão entre a parte radicular e a parte aérea (em termos de PS) foram registradas no final de cada fase. No fim da fase I, 5 plantas por tratamento foram separadas em raízes e parte aérea. No final do ensaio (fim da fase II) todas as plantas foram separadas em raízes, caules e folhas (uma vez que as plantas tiveram um crescimento substancial).

5.3 Resultados

5.3.1. Fase I

O grau de clorose foi determinado nas folhas jovens (apicais) totalmente expandidas e nas folhas velhas (basais). As leituras de SPAD foram convertidas em concentração total de clorofila ($\mu\text{mol m}^{-2}$) usando a equação de calibração pré-ajustada (Capítulo 2 - **Tabela 2.2**).

As plantas que cresceram sem Fe (**Fe0**) começaram a mostrar sintomas nas folhas jovens após 35 dias e os valores de clorofila diminuíram ao longo da fase I. As plantas que cresceram com Fe (**Fe120**) permaneceram verdes e apresentaram um aumento dos valores de clorofila durante toda esta fase (**Figura 5.3** e **Figura 5.4**). Nas folhas velhas, os valores de clorofila foram semelhantes e sem sintomas de clorose férrica.

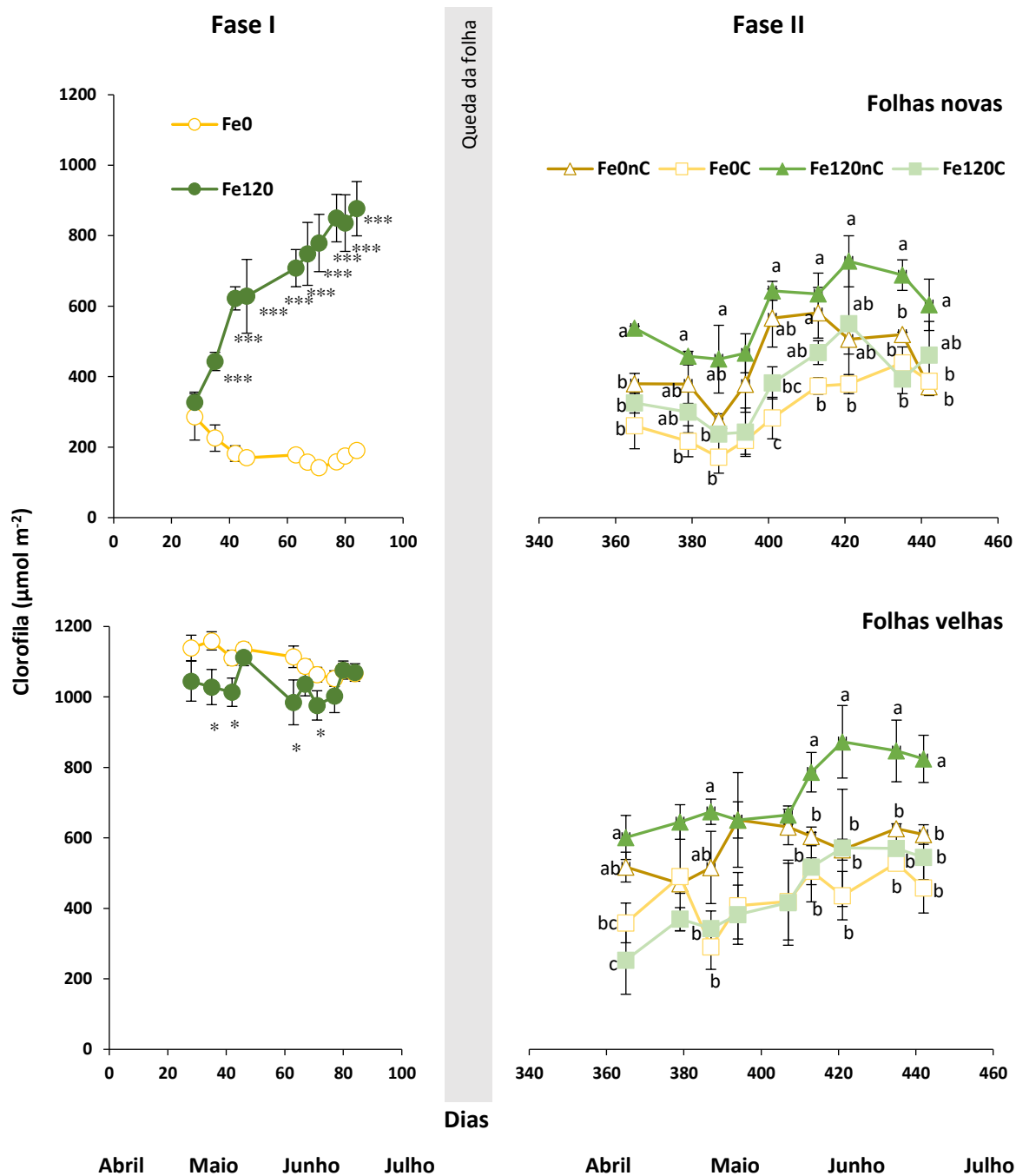


Figura 5.3. Variação da clorofila total (média \pm erro padrão) em folhas jovens e folhas velhas. Fase I, ensaio em solução nutritiva; Fase II, ensaio em vaso. A fase I terminou no final de julho (87 dias) quando as plantas foram transplantadas para os vasos. Os tratamentos são: **Fe0**, plantas que cresceram sem Fe; **Fe120**, plantas que cresceram com 120 μM de Fe; **Fe0nC**, plantas que cresceram sem Fe e posteriormente transplantadas para substrato sem calcário; **Fe0C**, plantas que cresceram sem Fe e posteriormente transplantadas para substrato com calcário; **Fe120nC**, plantas que cresceram com 120 μM de Fe e posteriormente transplantadas para substrato sem calcário; **Fe120C**, plantas que cresceram com 120 μM de Fe e posteriormente transplantadas para substrato com calcário. No outono, todas as folhas caíram (área cinzenta) e no seguinte mês de abril as primeiras medições foram realizadas no início da fase II. Letras diferentes indicam diferenças significativas para $P < 0,05$; $5 < n < 15$ para ambas as fases.



Figura 5.4. Aspecto geral das plantas no final do ensaio em solução nutritiva (fase I). Tratamentos são: **Fe0**, plantas que cresceram em solução nutritiva sem Fe; **Fe120**, plantas que cresceram em solução nutritiva com 120 μM de Fe.

Apesar das diferenças de clorofila nas folhas, as plantas **Fe0** desenvolveram bem, já que a altura da parte aérea (45 cm) e a razão entre o peso da parte radicular e da parte aérea (0,5) foram semelhantes entre tratamentos no final da fase I. (**Tabela 5.1**).

Tabela 5.1. Altura da planta e determinação da biomassa no final da fase I (87 dias a crescer em solução nutritiva). A atividade da enzima QFR também foi medida em ápices radiculares 48 e 78 dias após o início do ensaio e no final da fase I. Tratamentos são: **Fe0**, plantas que cresceram em solução nutritiva sem Fe; **Fe120**, plantas que cresceram em solução nutritiva com 120 μM de Fe.

	Tratamentos		
	Fe0	Fe120	
Altura (cm)	45 \pm 4	49 \pm 2	ns
<i>Peso seco:</i>			
Parte aérea (g)	6,27 \pm 0,75	4,30 \pm 0,31	**
Raiz (g)	3,01 \pm 0,37	2,05 \pm 0,10	*
Raiz/Parte aérea	0,49 \pm 0,04	0,49 \pm 0,04	ns
<i>QF-R:</i>			
(nmol Fe(II) $\text{min}^{-1} \text{g}^{-1}$ PF)			
48 dias	3,85 \pm 0,60	4,87 \pm 0,68	ns
78 dias	2,67 \pm 0,12	2,49 \pm 0,24	ns
87 dias	4,43 \pm 0,62	2,69 \pm 0,24	**

Média \pm erro padrão; PF, peso fresco *, ** ou *** indica, respetivamente diferença significativas para $P < 0,05$ ou $P < 0,01$ ou $P < 0,001$ (ANOVA; F test); n =5.

Entre os dias 48 e 87, a atividade da QFR diminuiu de 4,87 para 2,69 nas plantas do tratamento **Fe120** enquanto no tratamento **Fe0** a atividade aumentou de 3,85 para 4,43 nmol de Fe (II) $\text{min}^{-1} \text{g}^{-1}$ de PF. No final desta fase, a atividade foi significativamente superior nas plantas **Fe0** comparativamente as plantas **Fe120** (Tabela 5.1).

Nas raízes das plantas cloróticas (**Fe0**) os teores de P e Ca foram superiores comparativamente aos valores das plantas não-cloróticas (**Fe120**; Tabela 5.2). As plantas do tratamento **Fe120** apresentaram teores significativamente superiores de Fe total (1873 μg por planta) em comparação com plantas do tratamento **Fe0** (1021 μg por planta). Por outro lado, as plantas **Fe0** acumularam mais Cu e Zn. Não foram obtidas diferenças significativas relativamente aos restantes nutrientes (Tabela 5.2).

Tabela 5.2. Teor de nutrientes determinados nas raízes e parte aérea de cada tratamento no final da fase I (87 dias em solução nutritiva). Tratamentos são: **Fe0**, plantas que cresceram em solução nutritiva sem Fe; **Fe120**, plantas que cresceram em solução nutritiva com 120 µM de Fe.

	Tratamentos		
	Fe0	Fe120	
(mg por órgão)			
N			
<i>Parte aérea</i>	165 ± 22	110 ± 6	ns
<i>Raiz</i>	81 ± 11	56 ± 1	ns
P			
<i>Parte aérea</i>	20 ± 3	15 ± 0	ns
<i>Raiz</i>	19 ± 2	12 ± 1	*
K			
<i>Parte aérea</i>	106 ± 4	76 ± 6	ns
<i>Raiz</i>	49 ± 7	34 ± 0	ns
Mg			
<i>Parte aérea</i>	15 ± 2	10 ± 0	ns
<i>Raiz</i>	6 ± 1	4 ± 0	ns
Ca			
<i>Parte aérea</i>	69 ± 12	44 ± 2	ns
<i>Raiz</i>	21 ± 2	14 ± 0	*
(µg por órgão)			
Cu			
<i>Parte aérea</i>	59 ± 4	25 ± 2	**
<i>Raiz</i>	75 ± 4	19 ± 3	***
Zn			
<i>Parte aérea</i>	86 ± 17	54 ± 2	ns
<i>Raiz</i>	131 ± 4	76 ± 6	**
Mn			
<i>Parte aérea</i>	138 ± 31	96 ± 6	ns
<i>Raiz</i>	694 ± 145	437 ± 51	ns
Fe			
<i>Parte aérea</i>	439 ± 109	281 ± 14	ns
<i>Raiz</i>	582 ± 47	1592 ± 27	***

Média ± erro padrão; *, ** ou *** indica, respectivamente diferenças significativas para $P < 0,05$ ou $P < 0,01$ ou $P < 0,001$ (ANOVA; F test); ns – não significativo; n =5.

5.3.2. Fase II

A **Tabela 5.3** apresenta a caracterização dos dois substratos usados na fase II. O substrato com calcário (C) apresentou valores de pH, de ECA, de P e de K significativamente mais elevados, em comparação com o substrato sem calcário. O Fe

extraível, quantificado pelo método Fe_{ox} foi semelhante em ambos os substratos. No entanto, a razão Fe_{ox}/ECA foi significativamente inferior no substrato com calcário (C).

Tabela 5.3. Caracterização dos dois tipos de substratos (sem calcário e com calcário) usados na fase II.

Parâmetro ^a	Substrato		P
	sem calcário (nC)	com calcário (C)	
ECA (g kg ⁻¹)	6,7 ± 0,4	104,2 ± 0,4	***
pH	6,18 ± 0,02	7,79 ± 0,04	***
CE (dS m ⁻¹)	0,64 ± 0,24	0,48 ± 0,01	ns
MO (g kg ⁻¹)	11,7 ± 1,1	15,2 ± 2,0	ns
Argila (g kg ⁻¹)	222 ± 7	203 ± 13	ns
CTCc (cmol kg ⁻¹)	133 ± 4	154 ± 8	ns
Olsen P (mg kg ⁻¹)	34 ± 4	54 ± 4	**
K (mg kg ⁻¹)	261 ± 1	292 ± 4	**
<i>Fe Extraível:</i>			
Fe _d (mg kg ⁻¹)	12500 ± 651	6400 ± 132	**
Fe _{ox} (mg kg ⁻¹)	837 ± 30	998 ± 57	ns
(Fe _{ox} / ACCE) * 10 ⁴	1260 ± 42	96 ± 6	***

^a Média ± erro padrão. ECA, equivalente de calcário ativo; CTCc, capacidade de troca catiônica expressa em centimol de carga positiva por unidade de troca; CE, condutividade elétrica do extrato 1:5 (solo: água); OM, matéria orgânica; Fe_d, Fe extraível pelo citrato/bicarbonato/ditionite; Fe_{ox}, Fe extraível através de uma solução ácida de oxalato de amônio; ns: não significativo; ** ou *** indica diferenças significativas, respetivamente para P < 0,01 ou P < 0,001 (ANOVA; test F); n = 3.

Na fase II, os valores de clorofila foram menores em comparação com os valores obtidos na fase I, independentemente do tipo de folha. Após o descanso vegetativo (fase II), os valores de clorofila tanto nas folhas jovens como folhas velhas, foram inferiores nas plantas que cresceram no substrato com calcário, independente do tratamento de Fe durante a fase I (**Fe0** ou **Fe120**; **Figura 5.3**). Os valores mais elevados de clorofila foram observados nas plantas **Fe120nC** independentemente do tipo de folha.

As plantas transplantadas para o substrato com calcário (C) tiveram menores pesos secos na raiz e na parte aérea, independentemente da quantidade de Fe na solução nutritiva durante a fase I (**Tabela 5.4**).

A altura das plantas foi significativamente inferior no tratamento **Fe0C** (**Figura 5.5**).

Tal como acontece com os valores de clorofila, a atividade radicular da QFR durante a fase II (**Tabela 5.4**) foi, em geral, inferior à registada na fase I (**Tabela 5.1**). A maior atividade da QFR foi registrada nas plantas **Fe120C** (1,97 nmol de Fe (II) min⁻¹g⁻¹ de PF). Nos restantes tratamentos a atividade foi semelhante.

Tabela 5.4. Altura da planta, pesos secos e atividade da QFR (nmol Fe(II) min⁻¹ g⁻¹ PF) no final da fase II. Tratamentos são: **Fe0nC**, plantas que cresceram sem Fe e posteriormente transplantadas para substrato sem calcário; **Fe0C**, plantas que cresceram sem Fe e posteriormente transplantadas para substrato com calcário; **Fe120nC**, plantas que cresceram com 120 µM de Fe e posteriormente transplantadas para substrato sem calcário; **Fe120C**, plantas que cresceram com 120 µM de Fe e posteriormente transplantadas para substrato com calcário.

	sem calcário				com calcário			
	Fe0		Fe120		Fe0		Fe120	
Altura (cm)	78 ± 4	a	93 ± 12	a	47 ± 1	b	66 ± 6	ab
<i>Pesos secos:</i>								
Aérea (g)	33 ± 1	a	32 ± 10	a	10 ± 2	b	10 ± 2	b
Raiz (g)	12 ± 2	a	11 ± 3	ab	5 ± 1	bc	4 ± 1	c
R/A	0,35 ± 0,03	b	0,35 ± 0,03	b	0,48 ± 0,04	a	0,38 ± 0,06	ab
QFR	0,64 ± 0,04	b	0,82 ± 0,10	b	0,69 ± 0,19	b	1,97 ± 0,26	a

R/A, razão entre a parte aérea e a parte radicular (PS); Média ± erro padrão; diferentes letras na mesma linha indicam diferenças significativas para P < 0,05; n = 5.



Figura 5.5. Aspeto geral das plantas no final do ensaio em solo (fase II). Tratamentos são: **Fe0nC**, plantas que cresceram sem Fe e posteriormente transplantadas para substrato sem calcário; **Fe0C**, plantas que cresceram sem Fe e posteriormente transplantadas para substrato com calcário; **Fe120nC**, plantas que cresceram com 120 μM de Fe e posteriormente transplantadas para substrato sem calcário; **Fe120C**, plantas que cresceram com 120 μM de Fe e posteriormente transplantadas para substrato com calcário.

No final da fase II (**Figuras 5.6 e 5.7**), o teor de macronutrientes (N, P, K, Mg e Ca) foi superior nos caules comparativamente às raízes e folhas, enquanto os micronutrientes acumularam mais nas raízes, levando a um efeito significativo do órgão da planta (O) em todos os teores de nutrientes (**Tabela 5.5**). As plantas que cresceram em substrato sem calcário (nC), com ou sem Fe na fase I, apresentaram concentrações mais elevadas de N, P, K, Mg e Ca em todos os órgãos, comparativamente às plantas que cresceram em substrato com calcário, à exceção do Ca nas raízes (**Figura 5.6**). O efeito do solo foi, muito significativo, no entanto os tratamentos de Fe não interferiram, exceto nos conteúdos de Cu e Zn (**Tabela 5.7**).

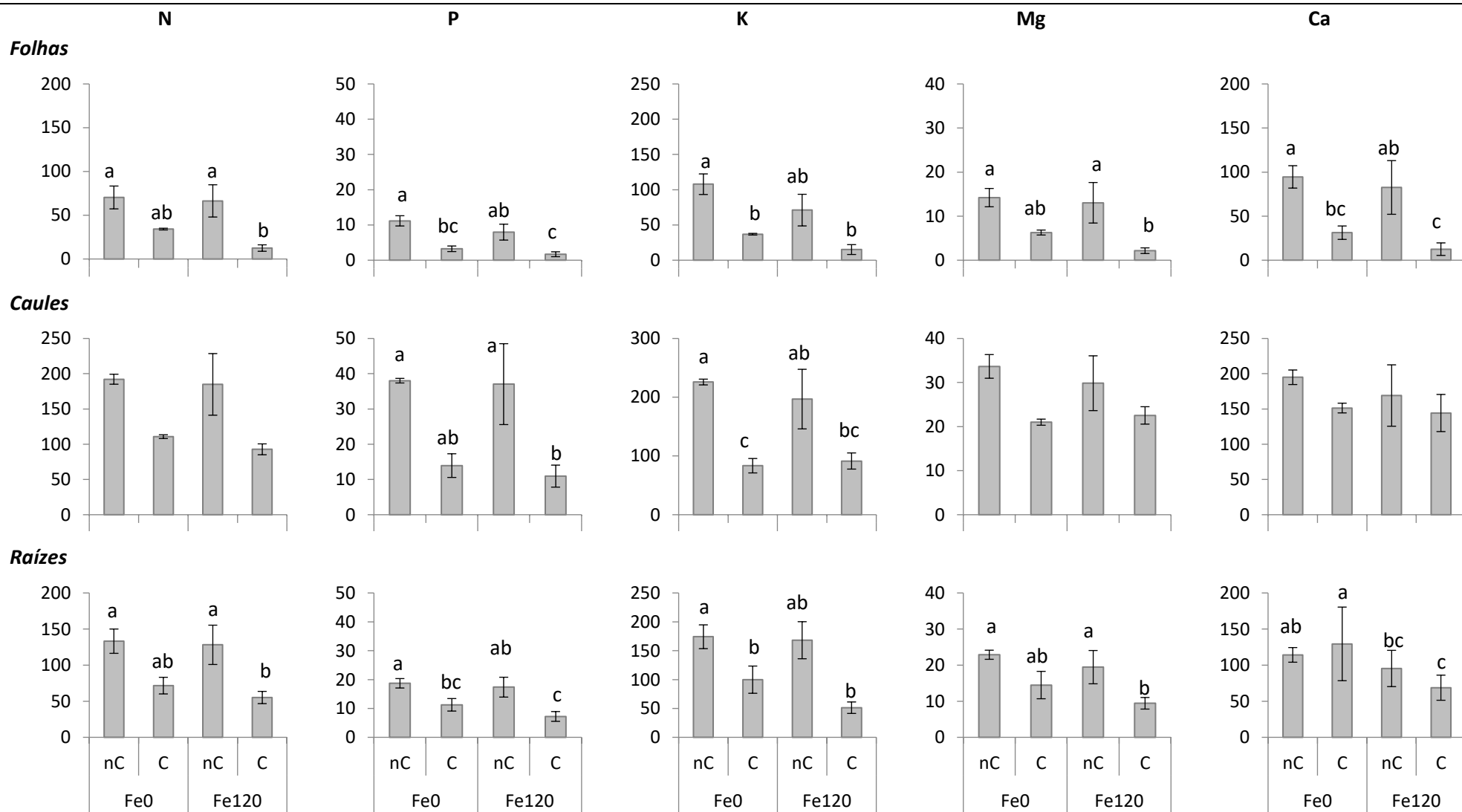


Figura 5.6. Teor de macronutrientes (mg por órgão) nos diferentes órgãos no final da fase II. As colunas correspondem a médias \pm erro padrão. Letras diferentes indicam diferenças significativas para $P < 0,05$; $n = 5$. Tratamentos são: **Fe0nC**, plantas que cresceram sem Fe e posteriormente transplantadas para substrato sem calcário; **Fe0C**, plantas que cresceram sem Fe e posteriormente transplantadas para substrato com calcário; **Fe120nC**, plantas que cresceram com 120 μM de Fe e posteriormente transplantadas para substrato sem calcário; **Fe120C**, plantas que cresceram com 120 μM de Fe e posteriormente transplantadas para substrato com calcário.

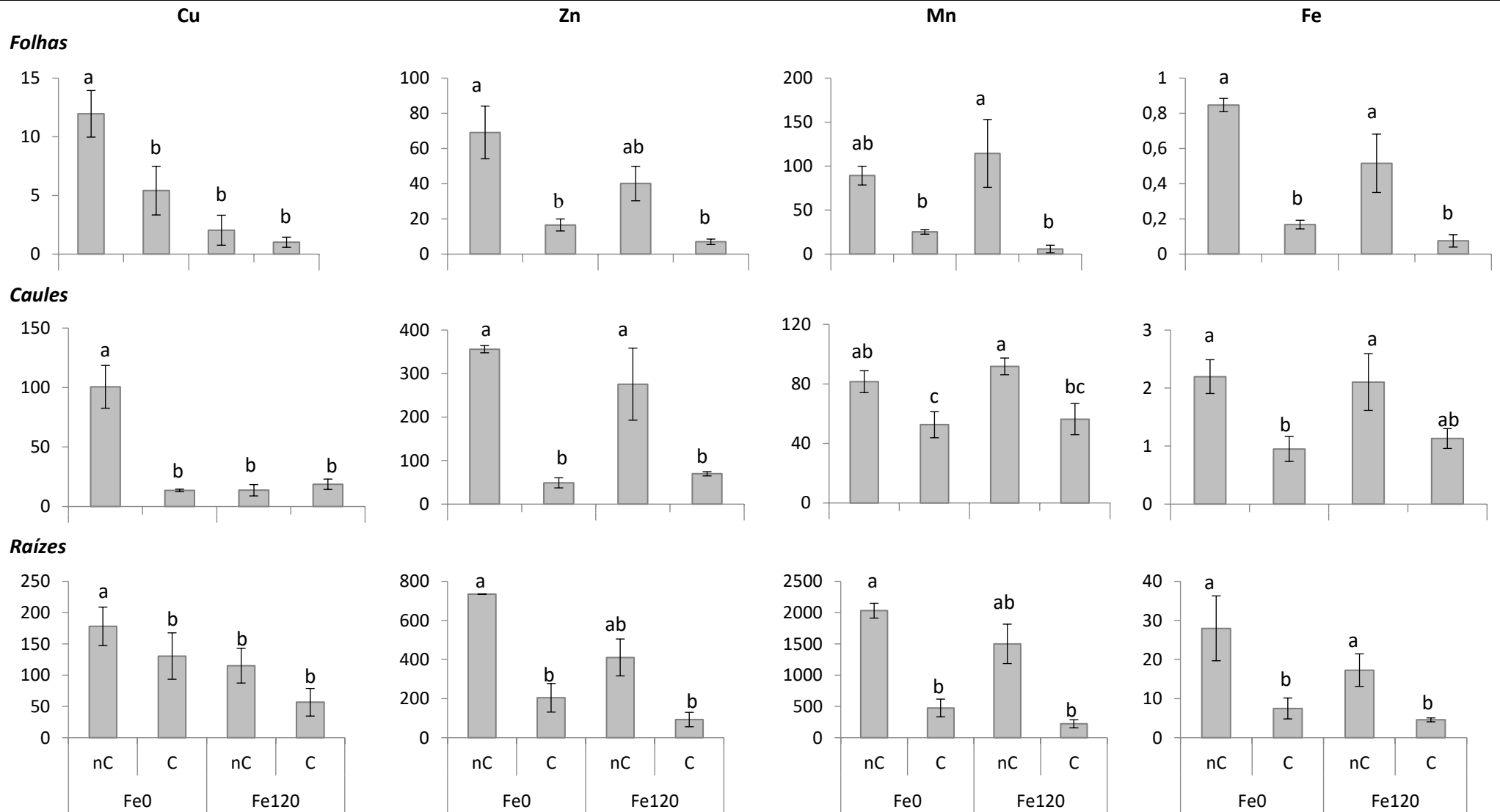


Figura 5.7. Teor de micronutrientes (μg por órgão) nos diferentes órgãos no final da fase II. As colunas correspondem a médias \pm erro padrão. Letras diferentes indicam diferenças significativas para $P < 0,05$; $n = 5$. Tratamentos são: **Fe0nC**, plantas que cresceram sem Fe e posteriormente transplantadas para substrato sem calcário; **Fe0C**, plantas que cresceram sem Fe e posteriormente transplantadas para substrato com calcário; **Fe120nC**, plantas que cresceram com $120 \mu\text{M}$ de Fe e posteriormente transplantadas para substrato sem calcário; **Fe120C**, plantas que cresceram com $120 \mu\text{M}$ de Fe e posteriormente transplantadas para substrato com calcário.

Nos caules as diferenças nos teores de N, Mg e Ca não foram significativas, no entanto foram observados valores superiores de macronutrientes nas folhas e nas raízes do tratamento **Fe0nC**. Quanto ao Zn, Mn e Fe, as respostas foram semelhantes, particularmente para Fe (**Figura 5.7**). Neste caso, observaram-se diferenças significativas entre plantas de cada tipo de substrato (nC e C). A exceção foi o Cu, uma vez que uma maior acumulação foi registrada apenas nas plantas **Fe0nC**. Em geral, as interações entre os fatores principais (órgãos das plantas, solo e nível de Fe durante a fase I) não foram significativas (**Tabela 5.5**).

Tabela 5.5. Níveis de significância de cada fator principal e interações para os teores de nutrientes no final da fase II.

Fatores principais	N	P	K	Mg	Ca	Cu	Zn	Mn	Fe
Substrato (S)	**	**	**	**	*	*	**	**	**
Tratamento de Fe (Fe)	ns	ns	ns	ns	ns	*	*	ns	ns
Órgão da planta (O)	**	**	**	**	**	**	**	**	**
S x Fe	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
S x O	ns	*	ns	ns	ns	ns	**	**	**
Fe x O	ns	ns	ns	ns	ns	ns	*	ns	ns
S x Fe x O	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

ns—não significativo, (*) significativo para $P < 0,05$ ou (**) $P < 0,01$ (ANOVA; teste F).

5.4. Discussão

O Fe não é um componente da clorofila, mas é necessário para a síntese da protoporfirina (Miller *et al.*, 1995). A diminuição acentuada dos teores de clorofila nas folhas jovens durante a fase I e o aparecimento de clorose férrica confirmam a baixa tolerância do *Poncirus trifoliata* à carência de Fe (Castle *et al.*, 2009; Forner-Giner *et al.*, 2009). No entanto, a ausência de clorofila na folha não afetou a acumulação de biomassa nas plantas cloróticas, uma vez que o peso seco das raízes, bem como a relação raiz parte aérea não foram significativamente diferentes entre os tratamentos.

Este resultado foi um pouco inesperado, uma vez que a clorose férrica geralmente reduz o crescimento vegetativo. No entanto, Forner-Giner *et al.* (2009) também relatam valores semelhantes de PS nas raízes e nas folhas de plantas de *Poncirus trifoliata* cultivadas com e sem Fe na solução de rega e essa falta de variação foi atribuída à curta duração dessa experiência (60 dias). Neste caso, é possível que os níveis endógenos de Fe das plantas de viveiro (cerca de 900 µg por planta no início da fase I) e os valores elevados de clorofila das folhas velhas durante toda a fase I tenham sido suficientes para garantir a disponibilidade de Fe ativo nestas plantas e ainda tenham contribuído para a fase seguinte. Durante a fase II, os valores de clorofila em ambos os tipos de folhas foram menores em comparação com a fase I, possivelmente devido à queda das folhas e retranslocação de nutrientes para o caule e associado ao esforço fisiológico feito pelas plantas na rebentação da primavera.

Em geral, a prévia imposição da ausência de Fe (na fase I) desencadeou menos Fe nas raízes e os resultados estão de acordo com os referidos também para citrinos (Martínez-Cuenca *et al.*, 2013; Pestana *et al.*, 2004), uma vez que o Fe total nas raízes **Fe0** (582 ± 81 µg) foi significativamente inferior ao registado nas plantas **Fe120** (1592 ± 47 µg). A ausência de Fe na solução nutritiva não interferiu com a absorção de N, K, Mg ou Mn nas plantas cloróticas, sugerindo que, nas condições experimentais, os principais mecanismos de absorção radicular não foram severamente afetados, o que também está coerente com o facto de a biomassa não diminuir significativamente neste intervalo de tempo. Curiosamente, no final da fase I, ocorreu um aumento de P e de Ca nas raízes de plantas deficientes de Fe, o que pode estar relacionado com a acumulação de fosfato de férrico e de outros compostos de P, como o ácido fítico originando acumulações de fitato de cálcio. Também nas plantas cloróticas ocorreu um aumento de Zn nas raízes e aumento significativo de Cu tanto nas raízes como na parte aérea.

De acordo com (Jiménez *et al.*, 2008) os níveis de Mn, Zn e Cu nas folhas do *Prunus* GF677 foram superiores em plantas com deficiência de Fe em comparados com os das plantas do controlo, resposta atribuída ao papel de transportadores não específicos. Por outro lado, a falta de Fe na solução nutritiva levou a um aumento do Cu na raiz em morangueiro (Pestana *et al.*, 2013) tendo sido relatado que o Cu e o Fe têm afinidade semelhante a diferentes sistemas enzimáticos (Cohu e Pilon, 2007). Assim, na ausência de Fe, aumenta a capacidade de redução o que resulta numa maior absorção de Cu.

A atividade da enzima QFR também aumentou nas plantas cloróticas comparativamente com as plantas controle na fase I. Esta é uma resposta bem conhecida encontrada nas plantas dicotiledóneas da estratégia I (Walker e Connolly, 2008) de modo a aumentar o Fe(II) metabolicamente ativo nas raízes. Num ensaio diferente, mas complementar (Pestana *et al.*, 2012b) registaram um aumento da atividade da QFR nas plantas de *Poncirus trifoliata* submetidas a uma pequena concentração de Fe (1 μ M) que foi adicionada à solução nutritiva, sugerindo que a ativação dessa enzima ocorre sob ausência total ou com uma pequena quantidade de Fe. Este resultado deve ser interpretado com atenção, pois pode não ser extrapolado para outras culturas. Por exemplo, em alguns porta-enxertos de *Prunus*, como 'Barrier' classificados como sensíveis à deficiência de Fe, não foi observado *in vivo* a indução da atividade da enzima QFR pela deficiência de Fe (Jiménez *et al.*, 2008).

Em conjunto, os resultados indicam que as plantas do tratamento **Fe0** ativaram mecanismos de resposta à deficiência de Fe sendo possível acompanhar as alterações e/ou adaptações quando transplantadas para o solo. A fase II foi utilizada para avaliar o comportamento das plantas em substrato sem calcário (ligeiramente ácido) e em substrato calcário.

É possível assumir que as adaptações fisiológicas das plantas cloróticas seriam uma vantagem em solos calcários?

Poncirus trifoliata é uma espécie de folha caduca (Agustí *et al.*, 2002) e todas as folhas caíram durante o inverno. Assim, a retranslocação de nutrientes das folhas para os caules ou raízes e a sua influência no comportamento subsequente, quer das plantas cloróticas como das não-cloróticas, devem ser tidas em consideração antes da queda das folhas.

Os nutrientes que são muito móveis no floema, como K e P, são retranslocados em árvores de folha caduca (Shi *et al.*, 2011) e também em árvores de folhas perenes (Correia e Martins-Loução, 1997). Antes da senescência foliar há um conjunto considerável de nutrientes que se tornam disponíveis para a rebentação da Primavera. Uma resposta diferente pode ser esperada para nutrientes que não são móveis. A este respeito, Shi *et al.* (2011) observaram que a senescência das folhas não promoveu a retranslocação do Fe e de outros micronutrientes em árvores de folha caduca, embora

estes dados não se verifiquem com os resultados relatados para o carvalho (Abadía *et al.*, 1996).

Neste ensaio, a presença de carbonatos no substrato foi um fator decisivo para a resposta da planta face às tendências observadas nos teores de clorofila nas folhas jovens e nas folhas velhas, que apresentaram valores superiores nos tratamentos **Fe0nC** e **Fe120nC**. Na videira, o crescimento vegetativo também diminuiu com a proporção crescente de carbonato de cálcio no solo independentemente do teor de óxido de Fe existente no substrato. (Díaz *et al.*, 2009).

No final de ensaio (442 dias), as condições adequadas no substrato sem calcário resultaram no bom crescimento vegetativo, uma desregulação da atividade QFR nas raízes e uma alta absorção de macro e micronutrientes. A severidade da clorose férrica nas diferentes culturas (Díaz *et al.*, 2010; Reyes *et al.*, 2006) pode ser estimada relacionado conteúdo de óxidos de Fe e pelos carbonatos no solo. Inicialmente os dois substratos usados na fase II apresentavam níveis semelhantes de óxidos de Fe (Fe_{ox}), fazendo querer que teriam igual disponibilidade de Fe. No entanto, e de acordo com Díaz *et al.* (2009) verificou-se que a razão $(Fe_{ox}/ECA) \times 10^4$ é um bom indicador da capacidade de induzir a clorose férrica em ambas as plantas (**Fe0** e **Fe120**) visto estar diretamente relacionada com um decréscimo na absorção de nutrientes nas plantas que cresceram anteriormente com um alto nível de Fe (**Fe120** na fase I).

Mesmo com este efeito do solo, devemos considerar a hipótese de uma "memória seletiva à ausência de Fe" presente nas plantas de **Fe0** na fase I. É possível tirar proveito dela?

As plantas que cresceram no substrato sem calcário (nC) responderam positivamente para a maioria dos teores de macro e micronutrientes. Aquelas que cresceram sob ausência de Fe na solução nutritiva (**Fe0**, na fase I) foram capazes de acumular na fase II uma quantidade similar de Fe em comparação com as plantas do tratamento **Fe120**, o que pode mostrar a existência de uma memória à ausência de Fe nas plantas **Fe0**, possivelmente devido a uma lenta desativação dos mecanismos de resposta à deficiência de Fe. Esta resposta também foi observada para os outros metais (Zn, Mn e em particular Cu). Isto significa que alguma sinalização interna permaneceu ativa ainda durante toda a fase II. No entanto, o Fe acumulado nas plantas de **Fe0** durante a fase I

foi provavelmente fisiologicamente inativado, explicando assim o baixo teor de clorofila nas folhas dos tratamentos **Fe0nC**. Conforme indicado por Abadía *et al.* (2011), os percursos de sinalização e os sensores de Fe nos mecanismos de regulação (homeostase) ainda não são totalmente compreendidos. Por fim, o conhecimento e aproveitamento destes mecanismos poderiam possibilitar o uso de genótipos não tolerantes em solos calcários, sem a necessidade de aplicar fertilizantes de Fe.

5.5. Conclusões

As plantas que cresceram sem Fe na solução nutritiva desenvolveram mecanismos de adaptação já conhecidos. A atividade da enzima QFR foi incrementada e houve uma absorção dos metais (Cu, Zn e Mn) em alternativa à do Fe no final da fase I.

A hipótese de que os mecanismos de resposta múltipla possam ser parte de uma memória seletiva à ausência de Fe e que possam ajudar as plantas a lidar com condições de campo adversas, foi avaliada neste estudo. Aparentemente, a homeostase do Fe e do Cu foi alterada pela deficiência de Fe, e conseqüentemente a sua mobilização nos órgãos das plantas.

Pelo contrário, a adição de Fe nas quantidades necessárias durante a fase de crescimento em solução nutritiva apesar de induzirem ao incremento dos teores de Fe à data do transplante, não pareceram ser uma vantagem para as plantas durante o crescimento em substrato calcário. Em última análise, as plantas que cresceram bem nutridas em Fe não apresentaram melhor desempenho em relação às plantas que cresceram sem Fe.

Deste modo, os resultados apontam para que os mecanismos de adaptação e o aumento nutricional induzidos pela deficiência de Fe podem ser utilizados como uma ferramenta de defesa que contribuirá para as plantas tolerarem melhor as diferentes restrições do solo em condições de campo. Em conclusão, a gestão do equilíbrio nutricional nas plantas de viveiro pode ser uma ferramenta para culturas bem-sucedidas e pode potencializar um melhor desempenho dos porta-enxertos em diferentes tipos de solos. Estes resultados são preliminares e deverão ser avaliados com outros porta-enxertos de citrinos com diferentes graus de tolerância à clorose férrica.

5.6. Agradecimentos

Este estudo foi financiado pelo Projeto Nacional da FCT - Fundação para Ciência e Tecnologia: PTDC/AGR-ALI/100115/2008 e Fundos FEDER através do Programa Operacional para Fatores de Competitividade - COMPETE. Recebeu ainda financiamento da FCT como parte do Projeto Estratégico: PEst-C/AGR/UI0115/2011. Os autores agradecem a "Associação de Viveiros de Coimbra" de Portugal por fornecer as plantas *Poncirus*. I. Díaz foi apoiada por uma doação de "IV plan próprio" da Universidade de Sevilha, em Espanha. F. Gama agradece a FCT a bolsa de doutoramento: SFRH/BD/89521/2012.

CAPÍTULO 6

CONCLUSÕES GERAIS

A qualidade dos produtos agrícolas para consumo humano está fortemente relacionada com o estado nutricional das plantas que é gravemente afetada pela deficiência em Fe, considerada um dos principais desequilíbrios nutritivos no mediterrâneo e na região do Algarve, particularmente em espécies instaladas em solos calcários.

O principal objetivo deste trabalho foi estudar o movimento e sinalização do Fe em plantas que desenvolvem a estratégia reductora (estratégia I) em resposta à deficiência de Fe e compreender o padrão de translocação de Fe em resposta à recuperação da deficiência. Pretendeu-se ainda identificar os ácidos orgânicos que atuam como transportadores de Fe, bem como esclarecer o papel de alguns mecanismos como a expressão do gene FRO1 e a atividade da QFR sob condições de deficiência de Fe e os mecanismos envolvidos na recuperação desta deficiência via reposição radicular de Fe. Este trabalho integra experiências que contribuem para o conhecimento da resposta da deficiência de Fe em diferentes culturas.

De um modo geral, a deficiência de Fe provocou decréscimos no teor de clorofila total e indução dos sintomas característicos, clorose internervuras das folhas mais jovens, após os quais foi possível observar acréscimos na atividade radicular da enzima QFR (à exceção do morangueiro) e alterações morfológicas a nível radicular. Como esperado, esta estratégia de resposta não foi eficiente em plantas que cresceram sem adição de Fe à solução nutritiva.

Os ensaios em solução nutritiva permitiram quantificar a partição dos nutrientes pelos diferentes órgãos. Numa primeira abordagem estudou-se como é que a deficiência de Fe altera o equilíbrio nutritivo? E se é possível retomar ao equilíbrio após um período de recuperação?

Como seria de esperar a deficiência de Fe levou a uma diminuição de absorção e translocação de Fe nos diferentes órgãos. No morangueiro o decréscimo do Fe incidiu nas raízes, na coroa e nas flores. Nas raízes de *Poncirus* o teor de Fe baixou mas não na parte aérea. Em ambas as espécies como alternativa à absorção de Fe ocorreu uma acumulação de metais como o Zn, o Mn e o Cu especialmente nas raízes e folhas novas. Relativamente aos compostos orgânicos que atuam como transportadores do Fe analisados no morangueiro verificou-se maiores teores nas folhas velhas e jovens nas

plantas cloróticas, possivelmente de forma a atingir as necessidades energéticas, extrusão de protões e solubilização do Fe. Também nas raízes de plantas cloróticas os teores reduzidos de ácido cítrico e málico poderá ser devido à exsudação radicular com finalidade de quelatar o Fe existente na solução. O pulso de Fe fornecido na solução nutritiva a plantas cloróticas de morangueiro levou à recuperação da deficiência em 12 dias. A partição de Fe foi direcionada para a coroa e para as flores que podem ser devidas a um mecanismo de desativação lenta da atividade da QFR associada à acumulação de ácidos sucínico e cítrico ao nível radicular e consequentemente permitiu maior absorção de Fe com ênfase para as flores e embora não analisados neste trabalho seria espectável que os frutos acumulassem maior quantidade de Fe contribuído de certo modo para a fortificação deste elemento na parte edível. O ideal seria futuramente testar e validar o efeito do *stress* de Fe e a recuperação da deficiência na qualidade dos frutos.

A expressão do gene FRO1 que codifica a enzima da QFR foi estudada em plantas de *Nicotiana benthamiana* e *Lycopersicum esculentum* e utilizou-se a técnica VIGS como uma nova abordagem para aprofundar o conhecimento do papel da QFR na raiz. Pretendeu-se estudar o que é que acontece quando o gene FRO é silenciado e quais as alterações que ocorrem na partição do Fe?

Em *Nicotiana benthamiana* a deficiência de Fe levou ao *upregulation* de expressão do gene FRO1 nas raízes e nas folhas novas associada a um aumento de atividade radicular de QFR. No entanto quando este gene é silenciado a expressão é *downregulated* (redução da expressão génica) em ambos os órgãos, a atividade da QFR é também reduzida e ocorreu uma alteração de distribuição do Fe entre folhas velhas e jovens. Não foi possível recuperar plantas com o gene silenciado através da reposição do Fe a nível radicular, as plantas não conseguiram retomar o metabolismo na síntese de clorofila nem ativar a enzima da QFR embora a distribuição do Fe entre folhas velhas e folhas jovens tenham estabilizado. Em *Lycopersicum esculentum* as plantas silenciadas diminuíram a síntese de clorofila, a atividade da QFR a nível radicular e a expressão de FRO1 relativa foram reduzidas. No entanto neste ensaio o efeito do silenciamento foi mais transiente e apenas foi observado na primeira fase do ensaio. Com estas experiências demonstrou-se ser possível silenciar o gene FRO1 nestas espécies utilizando um vetor VIGS construído com base no gene FRO1 do *Lycopersicum*

esculentum e produziu efeito de silenciamento na *Nicotiana benthamiana*. No entanto será necessário repetir estes ensaios para melhor compreender o mecanismo alternativo de absorção e translocação de Fe em plantas silenciadas, possivelmente através da aplicação localizada de diferentes fontes de Fe a nível foliar.

Um dos principais fatores indutores de clorose férrica é o ião bicarbonato que existe em elevadas concentrações nos solos calcários, e leva à inativação do Fe na planta. Nesta perspectiva foi estudado porta-enxertos de *Poncirus* com adaptação fisiológica e morfológica à deficiência de Fe, devido a uma imposição prévia que ativou a estratégia redutora nestas plantas e o comportamento quando transplantadas para dois solos diferentes: calcário e não calcário. É possível assumir que as adaptações fisiológicas das plantas cloróticas seriam uma vantagem em solos calcários? Será que os mecanismos das plantas que cresceram sem Fe na solução nutritiva se mantêm em solo?

As plantas que cresceram bem nutridas em Fe na fase de solução nutritiva não apresentaram melhor desempenho quando transplantadas para solo com calcário em relação às plantas que cresceram sem Fe. O crescimento e composição mineral são claramente reduzidos comparando com as plantas transferidas para vaso com solo não-calcário. Este resultado indica que os mecanismos de adaptação e o aumento nutricional induzidos pela deficiência de Fe podem ser utilizados como uma ferramenta de defesa que contribuirá para as plantas tolerarem melhor as diferentes restrições do solo em condições de campo. No futuro, será necessário repetir estes ensaios, para uma correta análise e reprodutibilidade dos resultados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A.O.A.C., 1990. Association of Official Agricultural Chemists. Official Methods of Analysis., 12th ed, Washington, D.C.

Abadía, A., Gil, E., Morales, F., Montañés, L., Montserrat, G., Abadía, J., 1996. Marcescence and senescence in a submediterranean oak (*Quercus subpyrenaica* EH del Villar): photosynthetic characteristics and nutrient composition. *Plant, Cell & Environment* 19, 685-694.

Abadía, J., Abadía, A., 1993. Iron and pigments, In: Barton, L.L., Hemming, B.C. (Eds.), Iron chelation in plants and soil microorganisms. Academic Press Inc., San Diego, CA, USA, pp. 327-343.

Abadía, J., López-Millán, A.-F., Rombolà, A., Abadía, A., 2002. Organic acids and Fe deficiency: a review. *Plant and Soil* 241, 75-86.

Abadía, J., Vázquez, S., Rellán-Álvarez, R., El-Jendoubi, H., Abadía, A., Álvarez-Fernández, A., López-Millán, A.F., 2011. Towards a knowledge-based correction of iron chlorosis. *Plant Physiology and Biochemistry* 49, 471-482.

Agüero, J., del Carmen Vives, M., Velázquez, K., Pina, J.A., Navarro, L., Moreno, P., Guerri, J., 2014. Effectiveness of gene silencing induced by viral vectors based on Citrus leaf blotch virus is different in *Nicotiana benthamiana* and citrus plants. *Virology* 460, 154-164.

Agustí, M., Martínez-Fuentes, A., Mesejo, C., 2002. Citrus fruit quality. Physiological basis and techniques of improvement. *Agrociencia* 6, 1-16.

Álvarez-Fernández, A., Abadía, J., Abadía, A., 2006. Iron deficiency, fruit yield and fruit quality. *Iron nutrition in plants and rhizospheric microorganisms* 4, 85-101.

Álvarez-Fernández, A., Melgar, J.C., Abadía, J., Abadía, A., 2011. Effects of moderate and severe iron deficiency chlorosis on fruit yield, appearance and composition in pear (*Pyrus communis* L.) and peach (*Prunus persica* (L.) Batsch). *Environmental and Experimental Botany* 71, 280-286.

Andaluz, S., López-Millán, A.F., Peleato, M.L., Abadía, J., Abadía, A., 2002. Increases in phosphoenolpyruvate carboxylase: a key response of sugar beet roots to iron-deficient. *Plant and Soil*, 43-48.

Araki, R., Murata, J., Murata, Y., 2011. A novel barley yellow stripe 1-like transporter (HvYSL2) localized to the root endodermis transports metal-phytosiderophore complexes. *Plant and Cell Physiology* 52, 1931-1940.

Arce-Rodríguez, M., Ochoa-Alejo, N., 2015. Silencing AT3 gene reduces the expression of pAmt, BCAT, Kas, and Acl genes involved in capsaicinoid biosynthesis in chili pepper fruits. *Biologia Plantarum* 59, 477-484.

Atwood, S.E., O'ROURKE, J.A., Peiffer, G.A., Yin, T., Majumder, M., Zhang, C., Cianzio, S.R., Hill, J.H., Cook, D., Whitham, S.A., 2014. Replication protein A subunit 3 and the iron efficiency response in soybean. *Plant, cell & environment* 37, 213-234.

Barberon, M., 2017. The endodermis as a checkpoint for nutrients. *New Phytologist* 213, 1604-1610.

Bashir, K., Inoue, H., Nagasaka, S., Takahashi, M., Nakanishi, H., Mori, S., Nishizawa, N.K., 2006. Cloning and characterization of deoxymugineic acid synthase genes from graminaceous plants. *Journal of Biological Chemistry* 281, 32395-32402.

Bashir, K., Ishimaru, Y., Shimo, H., Nagasaka, S., Fujimoto, M., Takanashi, H., Tsutsumi, N., An, G., Nakanishi, H., Nishizawa, N.K., 2011. The rice mitochondrial iron transporter is essential for plant growth. *Nature communications* 2, 322.

Becker, A., Lange, M., 2010. VIGS—genomics goes functional. *Trends in plant science* 15, 1-4.

Belkhodja, R., Morales, F., Sanz, M., Abadía, A., Abadía, J., 1998. Iron deficiency in peach trees: effects on leaf chlorophyll and nutrient concentrations in flowers and leaves. *Plant and Soil* 203, 257-268.

Bhattacharai, K.K., Li, Q., Liu, Y., Dinesh-Kumar, S.P., Kaloshian, I., 2007. The Mi-1-mediated pest resistance requires Hsp90 and Sgt1. *Plant Physiology* 144, 312-323.

- Bienfait, H.F., Bino, R.J., Van der Blick, A.M., Duivenvoorden, J.F., Fontaine, J.M., 1983. Characterization of ferric reducing activity in roots of Fe-deficient *Phaseolus vulgaris*. *Physiologia Plantarum* 59, 196-202.
- Bouyoucos, G.J., 1962. Hydrometer method improved for making particle size analyses of soils. *Agronomy journal* 54, 464-465.
- Brigneti, G., Martín-Hernández, A.M., Jin, H., Chen, J., Baulcombe, D.C., Baker, B., Jones, J.D., 2004. Virus-induced gene silencing in *Solanum* species. *The Plant Journal* 39, 264-272.
- Brumbarova, T., Bauer, P., Ivanov, R., 2015. Molecular mechanisms governing Arabidopsis iron uptake. *Trends in plant science* 20, 124-133.
- Brumbarova, T., Matros, A., Mock, H.P., Bauer, P., 2008. A proteomic study showing differential regulation of stress, redox regulation and peroxidase proteins by iron supply and the transcription factor FER. *The Plant Journal* 54, 321-334.
- Burch-Smith, T.M., Anderson, J.C., Martin, G.B., Dinesh-Kumar, S.P., 2004. Applications and advantages of virus-induced gene silencing for gene function studies in plants. *The Plant Journal* 39, 734-746.
- Carvalho, L.C., Dennis, P.G., Fedoseyenko, D., Hajirezaei, M.R., Borriss, R., von Wirén, N., 2011. Root exudation of sugars, amino acids, and organic acids by maize as affected by nitrogen, phosphorus, potassium, and iron deficiency. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 174, 3-11.
- Castle, W.S., Nunnallee, J., Manthey, J.A., 2009. Screening citrus rootstocks and related selections in soil and solution culture for tolerance to low-iron stress. *HortScience* 44, 638-645.
- Cesco, S., Neumann, G., Tomasi, N., Pinton, R., Weisskopf, L., 2010. Release of plant-borne flavonoids into the rhizosphere and their role in plant nutrition. *Plant and Soil* 329, 1-25.
- Chai, Y.-m., Jia, H.-f., Li, C.-l., Dong, Q.-h., Shen, Y.-y., 2011. FaPYR1 is involved in strawberry fruit ripening. *Journal of Experimental Botany* 62, 5079-5089.
- Chen, W.W., Yang, J.L., Qin, C., Jin, C.W., Mo, J.H., Ye, T., Zheng, S.J., 2010. Nitric oxide acts downstream of auxin to trigger root ferric-chelate reductase activity in response to iron deficiency in Arabidopsis. *Plant Physiology* 154, 810-819.
- Choi, H.W., Hwang, B.K., 2012. The pepper extracellular peroxidase CaPO2 is required for salt, drought and oxidative stress tolerance as well as resistance to fungal pathogens. *Planta* 235, 1369-1382.
- Clemens, S., Weber, M., 2016. The essential role of coumarin secretion for Fe acquisition from alkaline soil. *Plant signaling & behavior* 11, e1114197.
- Cohu, C.M., Pilon, M., 2007. Regulation of superoxide dismutase expression by copper availability. *Physiologia Plantarum* 129, 747-755.
- Colangelo, E.P., Guerinot, M.L., 2004. The essential basic helix-loop-helix protein FIT1 is required for the iron deficiency response. *The Plant Cell* 16, 3400-3412.
- Connolly, E.L., Campbell, N.H., Grotz, N., Prichard, C.L., Guerinot, M.L., 2003. Overexpression of the FRO2 ferric chelate reductase confers tolerance to growth on low iron and uncovers posttranscriptional control. *Plant Physiology* 133, 1102-1110.
- Connorton, J.M., Balk, J., Rodríguez-Celma, J., 2017. Iron homeostasis in plants—a brief overview. *Metallomics* 9, 813-823.
- Correia, P., Martins-Loução, M., 1997. Leaf nutrient variation in mature carob (*Ceratonia siliqua*) trees in response to irrigation and fertilization. *Tree physiology* 17, 813-819.
- Correia, P.J., Gama, F., Saavedra, T., Miguel, M.G., Da Silva, J.P., Abadía, A., de Varennes, A., Pestana, M., 2014. Changes in the concentration of organic acids in roots and leaves of carob-tree under Fe deficiency. *Functional Plant Biology* 41, 496-504.
- Costa, Â.M.A.d., 2014. Caracterização dos supressores p20 e p23 do Citrus tristeza virus e avaliação da possibilidade da sua inibição.
- Costes, E., Crespel, L., Denoyes, B., Morel, P., Demene, M.-N., Lauri, P.-E., Wenden, B., 2014. Bud structure, position and fate generate various branching patterns along shoots of closely related Rosaceae species: a review. *Frontiers in plant science* 5.

- Curie, C., Cassin, G., Couch, D., Divol, F., Higuchi, K., Le Jean, M., Misson, J., Schikora, A., Czernic, P., Mari, S., 2008. Metal movement within the plant: contribution of nicotianamine and yellow stripe 1-like transporters. *Annals of botany* 103, 1-11.
- Curie, C., Panaviene, Z., Loulergue, C., Dellaporta, S.L., Briat, J.-F., Walker, E.L., 2001. Maize yellow stripe1 encodes a membrane protein directly involved in Fe (III) uptake. *Nature* 409, 346-349.
- Díaz, I., Barrón, V., Del Campillo, M., Torrent, J., 2010. Testing the ability of vivianite to prevent iron deficiency in pot-grown grapevine. *Scientia horticulturae* 123, 464-468.
- Díaz, I., Del Campillo, M., Cantos, M., Torrent, J., 2009. Iron deficiency symptoms in grapevine as affected by the iron oxide and carbonate contents of model substrates. *Plant and soil* 322, 293-302.
- Drouineau, G., 1942. Dosage rapide du calcaire actif du sol: Nouvelles données sur la separation et la nature des fractions calcaires. *Ann. Agron* 12, 441-450.
- Eide, D., Broderius, M., Fett, J., Guerinot, M.L., 1996. A novel iron-regulated metal transporter from plants identified by functional expression in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93, 5624-5628.
- El-Baz, F., Mohamed, A.A., Aboul-Enein, A., Salama, Z.A., 2004. Alteration in root exudates level during Fe-deficiency in two cucumber cultivars. *Int J Agric Biol* 6, 45-48.
- El-Jendoubi, H., Vázquez, S., Calatayud, Á., Vavpetič, P., Vogel-Mikuš, K., Pelicon, P., Abadía, J., Abadía, A., Morales, F., 2014. The effects of foliar fertilization with iron sulfate in chlorotic leaves are limited to the treated area. A study with peach trees (*Prunus persica* L. Batsch) grown in the field and sugar beet (*Beta vulgaris* L.) grown in hydroponics. *Frontiers in plant science* 5.
- Enomoto, Y., Hodoshima, H., Shimada, H., Shoji, K., Yoshihara, T., Goto, F., 2007. Long-distance signals positively regulate the expression of iron uptake genes in tobacco roots. *Planta* 227, 81-89.
- Fan, T.W.-M., Lane, A.N., Pedler, J., Crowley, D., Higashi, R.M., 1997. Comprehensive analysis of organic ligands in whole root exudates using nuclear magnetic resonance and gas chromatography–mass spectrometry. *Analytical biochemistry* 251, 57-68.
- Fernández, V., Del Río, V., Pumariño, L., Igartua, E., Abadía, J., Abadía, A., 2008. Foliar fertilization of peach (*Prunus persica* (L.) Batsch) with different iron formulations: Effects on re-greening, iron concentration and mineral composition in treated and untreated leaf surfaces. *Scientia horticulturae* 117, 241-248.
- Forner-Giner, M., Llosá, M., Carrasco, J., Perez-Amador, M., Navarro, L., Ancillo, G., 2009. Differential gene expression analysis provides new insights into the molecular basis of iron deficiency stress response in the citrus rootstock *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. *Journal of experimental botany* 61, 483-490.
- Fourcroy, P., Sisó-Terraza, P., Sudre, D., Savirón, M., Rey, G., Gaymard, F., Abadía, A., Abadía, J., Álvarez-Fernández, A., Briat, J.F., 2014. Involvement of the ABCG37 transporter in secretion of scopoletin and derivatives by *Arabidopsis* roots in response to iron deficiency. *New Phytologist* 201, 155-167.
- Fox, P.L., 2003. The copper-iron chronicles: the story of an intimate relationship. *Biometals* 16, 9-40.
- Fu, D.Q., Zhu, B.Z., Zhu, H.L., Jiang, W.B., Luo, Y.B., 2005. Virus-induced gene silencing in tomato fruit. *The Plant Journal* 43, 299-308.
- Gama, F., Saavedra, T., da Silva, J.P., Miguel, M.G., de Varennes, A., Correia, P.J., Pestana, M., 2016. The memory of iron stress in strawberry plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 104, 36-44.
- Gayomba, S.R., Zhai, Z., Jung, H.-i., Vatamaniuk, O.K., 2015. Local and Systemic Signaling of Iron Status and Its Interactions with Homeostasis of Other Essential Elements. *Frontiers in Plant Science* 6, 716.
- Ghoshal, B., Sanfaçon, H., 2015. Symptom recovery in virus-infected plants: Revisiting the role of RNA silencing mechanisms. *Virology* 479, 167-179.

- Giehl, R.F., Lima, J.E., von Wirén, N., 2012. Localized iron supply triggers lateral root elongation in *Arabidopsis* by altering the AUX1-mediated auxin distribution. *The Plant Cell* 24, 33-49.
- Gonzalo, M.J., Moreno, M.Á., Gogorcena, Y., 2011. Physiological responses and differential gene expression in *Prunus* rootstocks under iron deficiency conditions. *Journal of plant physiology* 168, 887-893.
- Goodin, M.M., Zaitlin, D., Naidu, R.A., Lommel, S.A., 2008. *Nicotiana benthamiana*: its history and future as a model for plant-pathogen interactions. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 21, 1015-1026.
- Graziano, M., Lamattina, L., 2007. Nitric oxide accumulation is required for molecular and physiological responses to iron deficiency in tomato roots. *The Plant Journal* 52, 949-960.
- Grusak, M.A., Pearson, J., Marentes, E., 1999. The physiology of micronutrient homeostasis in field crops. *Field crops research* 60, 41-56.
- Guerinot, M.L., Yi, Y., 1994. Iron: nutritious, noxious, and not readily available. *Plant Physiology* 104, 815.
- Hall, D., Gibson, J., Whatley, F., 1966. Electron spin resonance spectra of spinach ferredoxin. *Biochemical and biophysical research communications* 23, 81-84.
- Harrison, P.M., Arosio, P., 1996. The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* 1275, 161-203.
- He, X., Jin, C., Li, G., You, G., Zhou, X., Zheng, S., 2008. Use of the modified viral satellite DNA vector to silence mineral nutrition-related genes in plants: silencing of the tomato ferric chelate reductase gene, *FRO1*, as an example. *Science in China Series C: Life Sciences* 51, 402-409.
- Heide, O., Stavang, J., Sønsteby, A., 2013. Physiology and genetics of flowering in cultivated and wild strawberries-A review. *J. Hort. Sci. Biotechnol* 88, 1-18.
- Hindt, M.N., Guerinot, M.L., 2012. Getting a sense for signals: regulation of the plant iron deficiency response. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research* 1823, 1521-1530.
- Hiriart, J.-B., Lehto, K., Tyystjärvi, E., Junttila, T., Aro, E.-M., 2002. Suppression of a key gene involved in chlorophyll biosynthesis by means of virus-inducing gene silencing. *Plant molecular biology* 50, 213-224.
- Huma, N., Salim-Ur-Rehman, Anjum, F.M., Murtaza, M.A., Sheikh, M.A., 2007. Food fortification strategy—preventing iron deficiency anemia: a review. *Critical reviews in food science and nutrition* 47, 259-265.
- Inoue, H., Kobayashi, T., Nozoye, T., Takahashi, M., Kakei, Y., Suzuki, K., Nakazono, M., Nakanishi, H., Mori, S., Nishizawa, N.K., 2009. Rice *OsYSL15* is an iron-regulated iron (III)-deoxymugineic acid transporter expressed in the roots and is essential for iron uptake in early growth of the seedlings. *Journal of Biological Chemistry* 284, 3470-3479.
- Ishimaru, Y., Suzuki, M., Tsukamoto, T., Suzuki, K., Nakazono, M., Kobayashi, T., Wada, Y., Watanabe, S., Matsushashi, S., Takahashi, M., 2006. Rice plants take up iron as an Fe³⁺-phytosiderophore and as Fe²⁺. *The Plant Journal* 45, 335-346.
- Ivanov, R., Brumbarova, T., Bauer, P., 2012. Fitting into the harsh reality: regulation of iron-deficiency responses in dicotyledonous plants. *Molecular Plant* 5, 27-42.
- Jain, A., Wilson, G.T., Connolly, E.L., 2014. The diverse roles of *FRO* family metalloreductases in iron and copper homeostasis. *Frontiers in plant science* 5, 1-6.
- Jelali, N., Dell'orto, M., Abdelly, C., Gharsalli, M., Zocchi, G., 2010. Changes of metabolic responses to direct and induced Fe deficiency of two *Pisum sativum* cultivars. *Environmental and experimental botany* 68, 238-246.
- Jeong, J., Cohu, C., Kerkeb, L., Pilon, M., Connolly, E.L., Guerinot, M.L., 2008. Chloroplast Fe (III) chelate reductase activity is essential for seedling viability under iron limiting conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105, 10619-10624.
- Jeong, J., Connolly, E.L., 2009. Iron uptake mechanisms in plants: functions of the *FRO* family of ferric reductases. *Plant Science* 176, 709-714.

- Jiménez, S., Pinochet, J., Abadía, A., Moreno, M.Á., Gogorcena, Y., 2008. Tolerance response to iron chlorosis of *Prunus* selections as rootstocks. *HortScience* 43, 304-309.
- Jin, C.W., You, G.Y., He, Y.F., Tang, C., Wu, P., Zheng, S.J., 2007. Iron deficiency-induced secretion of phenolics facilitates the reutilization of root apoplastic iron in red clover. *Plant Physiology* 144, 278-285.
- Kafkas, E., Silberbush, M., Paydas, S., 2007. Physiological characterization of strawberry cultivars with differential susceptibility to iron deficiency. *World Journal of Agricultural Sciences* 3, 196-203.
- Kandath, P.K., Heinz, R., Yeckel, G., Gross, N.W., Juvale, P.S., Hill, J., Whitham, S.A., Baum, T.J., Mitchum, M.G., 2013. A virus-induced gene silencing method to study soybean cyst nematode parasitism in *Glycine max*. *BMC research notes* 6, 1.
- Kobayashi, T., Nakanishi, H., Nishizawa, N.K., 2010. Dual regulation of iron deficiency response mediated by the transcription factor IDEF1. *Plant signaling & behavior* 5, 157-159.
- Kobayashi, T., Nishizawa, N.K., 2012. Iron uptake, translocation, and regulation in higher plants. *Annual review of plant biology* 63, 131-152.
- Kobayashi, T., Ogo, Y., Itai, R.N., Nakanishi, H., Takahashi, M., Mori, S., Nishizawa, N.K., 2007. The transcription factor IDEF1 regulates the response to and tolerance of iron deficiency in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, 19150-19155.
- Lange, M., Yellina, A.L., Orashakova, S., Becker, A., 2013. Virus-induced gene silencing (VIGS) in plants: an overview of target species and the virus-derived vector systems. *Virus-Induced Gene Silencing: Methods and Protocols*, 1-14.
- Larbi, A., Abadía, A., Abadía, J., Morales, F., 2006. Down co-regulation of light absorption, photochemistry, and carboxylation in Fe-deficient plants growing in different environments. *Photosynthesis Research* 89, 113-126.
- Larbi, A., Morales, F., Abadía, A., Abadía, J., 2010. Changes in iron and organic acid concentrations in xylem sap and apoplastic fluid of iron-deficient *Beta vulgaris* plants in response to iron resupply. *Journal of plant physiology* 167, 255-260.
- Legay, S., Guignard, C., Ziebel, J., Evers, D., 2012. Iron uptake and homeostasis related genes in potato cultivated in vitro under iron deficiency and overload. *Plant physiology and biochemistry* 60, 180-189.
- Li, C., Yan, J.-M., Li, Y.-Z., Zhang, Z.-C., Wang, Q.-L., Liang, Y., 2013. Silencing the SpMPK1, SpMPK2, and SpMPK3 genes in tomato reduces abscisic acid—mediated drought tolerance. *International journal of molecular sciences* 14, 21983-21996.
- Li, L., Cheng, X., Ling, H.-Q., 2004. Isolation and characterization of Fe (III)-chelate reductase gene LeFRO1 in tomato. *Plant molecular biology* 54, 125-136.
- Lichtenthaler, H.K., 1987. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology* 148, 350-382.
- Ling, H.-Q., Bauer, P., Berczky, Z., Keller, B., Ganai, M., 2002. The tomato fer gene encoding a bHLH protein controls iron-uptake responses in roots. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99, 13938-13943.
- Liu, Y., Schiff, M., Dinesh-Kumar, S., 2002. Virus-induced gene silencing in tomato. *The Plant Journal* 31, 777-786.
- Loeppert, R., 1986. Reactions of iron and carbonates in calcareous soils. *Journal of Plant Nutrition* 9, 195-214.
- Long, T.A., Tsukagoshi, H., Busch, W., Lahner, B., Salt, D.E., Benfey, P.N., 2010. The bHLH transcription factor POPEYE regulates response to iron deficiency in *Arabidopsis* roots. *The Plant Cell* 22, 2219-2236.
- López-Millán, A.F., Morales, F., Abadía, A., Abadía, J., 2000. Effects of iron deficiency on the composition of the leaf apoplastic fluid and xylem sap in sugar beet. Implications for iron and carbon transport. *Plant Physiology* 124, 873-884.

- López-Millán, A.F., Morales, F., Gogorcena, Y., Abadía, A., Abadía, J., 2001. Iron resupply-mediated deactivation of Fe-deficiency stress responses in roots of sugar beet. *Functional Plant Biology* 28, 171-180.
- López-Millán, A.F., Morales, F., Gogorcena, Y., Abadía, A., Abadía, J., 2009. Metabolic responses in iron deficient tomato plants. *Journal of plant physiology* 166, 375-384.
- López-Millán, A.F., Morales, F., Abadía, A., Abadía, J., 2001. Changes induced by Fe deficiency and Fe resupply in the organic acid metabolism of sugar beet (*Beta vulgaris*) leaves. *Physiologia Plantarum* 112, 31-38.
- Lucena, C., Romera, F.J., Rojas, C.L., García, M.J., Alcántara, E., Pérez-Vicente, R., 2007. Bicarbonate blocks the expression of several genes involved in the physiological responses to Fe deficiency of Strategy I plants. *Functional Plant Biology* 34, 1002-1009.
- Lucena, J.J., 2006. Synthetic iron chelates to correct iron deficiency in plants, Iron nutrition in plants and rhizospheric microorganisms. Springer, pp. 103-128.
- Markwell, J., Osterman, J.C., Mitchell, J.L., 1995. Calibration of the Minolta SPAD-502 leaf chlorophyll meter. *Photosynthesis research* 46, 467-472.
- Marschner, H., Rimmington, G., 1988. Mineral nutrition of higher plants. *Plant Cell Environ* 11, 147-148.
- Marschner, H., Römheld, V., Kissel, M., 1986. Different strategies in higher plants in mobilization and uptake of iron. *Journal of plant nutrition* 9, 695-713.
- Martínez-Cuenca, M.-R., Iglesias, D.J., Talón, M., Abadía, J., López-Millán, A.-F., Primo-Millo, E., Legaz, F., 2013. Metabolic responses to iron deficiency in roots of Carrizo citrange [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck. × *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.]. *Tree physiology* 33, 320-329.
- McCluskey, J., Herdman, L., Skene, K.R., 2004. Iron deficiency induces changes in metabolism of citrate in lateral roots and cluster roots of *Lupinus albus*. *Physiologia Plantarum* 121, 586-594.
- Mehlich, A., 1948. Determination of cation-and anion-exchange properties of soils. *Soil Science* 66, 429-446.
- Mehra, O., Jackson, M., 1958. Iron oxide removal from soils and clays by a dithionite-citrate system buffered with sodium bicarbonate, National conference on clays and clays minerals, pp. 317-327.
- Mengel, K., Breining, M.T., Bubl, W., 1984. Bicarbonate, the most important factor inducing iron chlorosis in wine grapes on calcareous soil. *Plant and Soil* 81, 333-334.
- Menzel, C.M., Smith, L., 2014. The growth and productivity of 'Festival' strawberry plants growing in a subtropical environment. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* 42, 60-75.
- Miller, G., Huang, I.J., Welkie, G., Pushnik, J., 1995. Function of iron in plants with special emphasis on chloroplasts and photosynthetic activity, *Iron nutrition in soils and plants*. Springer, pp. 19-28.
- Morales, F., Abadía, A., Abadía, J., 1990. Characterization of the xanthophyll cycle and other photosynthetic pigment changes induced by iron deficiency in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Plant Physiology* 94, 607-613.
- Morales, F., Grasa, R., Abadía, A., Abadía, J., 1998. Iron chlorosis paradox in fruit trees. *Journal of Plant Nutrition* 21, 815-825.
- Mori, S., 1999. Iron acquisition by plants. *Current opinion in plant biology* 2, 250-253.
- Mozafar, A., 1997. Distribution of nutrient elements along the maize leaf: Alteration by iron deficiency. *Journal of plant nutrition* 20, 999-1005.
- Mukherjee, I., Campbell, N.H., Ash, J.S., Connolly, E.L., 2006. Expression profiling of the *Arabidopsis* ferric chelate reductase (FRO) gene family reveals differential regulation by iron and copper. *Planta* 223, 1178-1190.
- Murgia, I., Tarantino, D., Soave, C., Morandini, P., 2011. *Arabidopsis* CYP82C4 expression is dependent on Fe availability and circadian rhythm, and correlates with genes involved in the early Fe deficiency response. *Journal of plant physiology* 168, 894-902.

- Nishiyama, R., Kato, M., Nagata, S., Yanagisawa, S., Yoneyama, T., 2012. Identification of Zn–nicotianamine and Fe–2'-deoxymugineic acid in the phloem sap from rice plants (*Oryza sativa* L.). *Plant and Cell Physiology* 53, 381-390.
- Nozoye, T., Nagasaka, S., Kobayashi, T., Sato, Y., Uozumi, N., Nakanishi, H., Nishizawa, N.K., 2015. The phyto siderophore efflux transporter TOM2 is involved in metal transport in rice. *Journal of Biological Chemistry* 290, 27688-27699.
- Nozoye, T., Nagasaka, S., Kobayashi, T., Takahashi, M., Sato, Y., Sato, Y., Uozumi, N., Nakanishi, H., Nishizawa, N.K., 2011. Phyto siderophore efflux transporters are crucial for iron acquisition in graminaceous plants. *Journal of Biological Chemistry* 286, 5446-5454.
- Ohwaki, Y., Sugahara, K., 1997. Active extrusion of protons and exudation of carboxylic acids in response to iron deficiency by roots of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Plant and Soil* 189, 49-55.
- Olsen, R.A., Sommers, L.E., 1982. Phosphorus, In: Page, A.L., Miller, R.H., Keeney, D.R. (Eds.), *Methods of soil analysis. Part 2.* Soil Sci. Soc. Am. Inc., Madison, WI, pp. 403-430.
- Orzaez, D., Mirabel, S., Wieland, W.H., Granell, A., 2006. Agroinjection of tomato fruits. A tool for rapid functional analysis of transgenes directly in fruit. *Plant Physiology* 140, 3-11.
- Osório, J., Osório, M.L., Correia, P.J., de Varennes, A., Pestana, M., 2014. Chlorophyll fluorescence imaging as a tool to understand the impact of iron deficiency and resupply on photosynthetic performance of strawberry plants. *Scientia Horticulturae* 165, 148-155.
- Palmer, C.M., Guerinot, M.L., 2009. Facing the challenges of Cu, Fe and Zn homeostasis in plants. *Nature chemical biology* 5, 333-340.
- Pedas, P., Ytting, C.K., Fuglsang, A.T., Jahn, T.P., Schjoerring, J.K., Husted, S., 2008. Manganese efficiency in barley: identification and characterization of the metal ion transporter HvIRT1. *Plant physiology* 148, 455-466.
- Pestana, M., Correia, P.J., de Varennes, A., Abadía, J., Faria, E.A., 2001a. The use of floral analysis to diagnose the nutritional status of orange trees. *Journal of Plant Nutrition* 24, 1913-1923.
- Pestana, M., Correia, P.J., Saavedra, T., Gama, F., Abadía, A., de Varennes, A., 2012a. Development and recovery of iron deficiency by iron resupply to roots or leaves of strawberry plants. *Plant physiology and biochemistry* 53, 1-5.
- Pestana, M., Correia, P.J., Saavedra, T., Gama, F., Dandlen, S., Nolasco, G., Varennes, A.d., 2013. Root ferric chelate reductase is regulated by iron and copper in strawberry plants. *Journal of Plant Nutrition* 36, 2035-2047.
- Pestana, M., David, M., de Varennes, A., Abadía, J., Faria, E.A., 2001b. Responses of “Newhall” orange trees to iron deficiency in hydroponics: effects on leaf chlorophyll, photosynthetic efficiency, and root ferric chelate reductase activity. *Journal of Plant Nutrition* 24, 1609-1620.
- Pestana, M., de Varennes, A., Abadía, J., Faria, E.A., 2005. Differential tolerance to iron deficiency of citrus rootstocks grown in nutrient solution. *Scientia Horticulturae* 104, 25-36.
- Pestana, M., de Varennes, A., Faria, E.A., 2003. Diagnosis and correction of iron chlorosis in fruit trees: a review. *Food, Agriculture & Environment* 1, 46-51.
- Pestana, M., de Varennes, A., Faria, E.A., 2004. Lime-induced iron chlorosis in fruit trees., In: Dris, R., Jain, S.M. (Eds.), *Production practices and quality assessment of food crops. Volume 2: Plant mineral nutrition and pesticide management.* Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands., pp. 171-215.
- Pestana, M., Domingos, I., Gama, F., Dandlen, S., Miguel, M.G., Castro Pinto, J., de Varennes, A., Correia, P.J., 2011. Strawberry recovers from iron chlorosis after foliar application of a grass-clipping extract. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 174, 473-479.
- Pestana, M., Gama, F., Saavedra, T., de Varennes, A., Correia, P., 2012b. The root ferric-chelate reductase of *Ceratonia siliqua* (L.) and *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. responds differently to a low level of iron. *Scientia horticulturae* 135, 65-67.
- Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR. *Nucleic acids research* 29, e45-e45.

- Pii, Y., Penn, A., Terzano, R., Crecchio, C., Mimmo, T., Cesco, S., 2015. Plant-microorganism-soil interactions influence the Fe availability in the rhizosphere of cucumber plants. *Plant physiology and biochemistry* 87, 45-52.
- Ratcliff, F., Martin-Hernandez, A.M., Baulcombe, D.C., 2001. Technical advance: tobacco rattle virus as a vector for analysis of gene function by silencing. *The Plant Journal* 25, 237-245.
- Rellán-Álvarez, R., El-Jendoubi, H., Wohlgemuth, G., Abadía, A., Fiehn, O., Abadía, J., Álvarez-Fernández, A., 2011. Metabolite profile changes in xylem sap and leaf extracts of strategy I plants in response to iron deficiency and resupply. *Frontiers in plant science* 2.
- Rellán-Álvarez, R., Giner-Martínez-Sierra, J., Orduna, J., Orera, I., Rodríguez-Castrillón, J.Á., García-Alonso, J.I., Abadía, J., Álvarez-Fernández, A., 2010. Identification of a tri-iron (III), tri-citrate complex in the xylem sap of iron-deficient tomato resupplied with iron: new insights into plant iron long-distance transport. *Plant and Cell Physiology* 51, 91-102.
- Rellán-Álvarez, R., Abadía, J., Álvarez-Fernández, A., 2008. Formation of metal-nicotianamine complexes as affected by pH, ligand exchange with citrate and metal exchange. A study by electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 22, 1553-1562.
- Reyes, J., Del Campillo, M., Torrent, J., 2006. Soil Properties Influencing Iron Chlorosis in Grapevines Grown in the Montilla-Moriles Area, Southern Spain. *Communications in soil science and plant analysis* 37, 1723-1729.
- Ricachenevsky, F.K., Sperotto, R.A., 2014. There and back again, or always there? The evolution of rice combined strategy for Fe uptake. *Frontiers in plant science* 5.
- Riehm, H., 1958. Die ammoniumlaktatessigsäure-methode zur bestimmung der leichtlöslichen phosphorsäure in karbonathaltigen boden. *Agrochimica* 3, 49-65.
- Robinson, N.J., Procter, C.M., Connolly, E.L., Guerinot, M.L., 1999. A ferric-chelate reductase for iron uptake from soils. *Nature* 397, 694-697.
- Rodríguez-Celma, J., Vázquez-Reina, S., Orduna, J., Abadía, A., Abadía, J., Álvarez-Fernández, A., López-Millán, A.-F., 2011. Characterization of flavins in roots of Fe-deficient strategy I plants, with a focus on *Medicago truncatula*. *Plant and Cell Physiology* 52, 2173-2189.
- Rombolà, A., Tagliavini, M., 2006. Iron Nutrition of Fruit Tree Crops, In: Barton, L., Abadia, J. (Eds.), *Iron Nutrition in Plants and Rhizospheric Microorganisms*. Springer Netherlands, pp. 61-83.
- Rombolà, A., Toselli, M., Carpintero, J., Ammari, T., Quartieri, M., Torrent, J., Marangoni, B., 2003. Prevention of Iron-Deficiency Induced Chlorosis in Kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) Through Soil Application of Synthetic Vivianite in a Calcareous Soil. *Journal of plant nutrition* 26, 2031-2041.
- Romheld, V., Marschner, H., 1986. Mobilization of iron in the rhizosphere of different plant species. *Advances in plant nutrition (USA)*.
- Ryu, C.M., Anand, A., Kang, L., Mysore, K.S., 2004. Agrodrench: a novel and effective agroinoculation method for virus-induced gene silencing in roots and diverse Solanaceous species. *The Plant Journal* 40, 322-331.
- Sahu, P.P., Puranik, S., Khan, M., Prasad, M., 2012. Recent advances in tomato functional genomics: utilization of VIGS. *Protoplasma* 249, 1017-1027.
- Santi, S., Cesco, S., Varanini, Z., Pinton, R., 2005. Two plasma membrane H⁺-ATPase genes are differentially expressed in iron-deficient cucumber plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 43, 287-292.
- Santi, S., Schmidt, W., 2009. Dissecting iron deficiency-induced proton extrusion in *Arabidopsis* roots. *New Phytologist* 183, 1072-1084.
- Santos, C.S., Silva, A.I., Serrão, I., Carvalho, A.L., Vasconcelos, M.W., 2013. Transcriptomic analysis of iron deficiency related genes in the legumes. *Food research international* 54, 1162-1171.
- Schmidt, W., Janiesch, P., 1991. Ferric reduction by *geum urbanum*: a kinetic study. *Journal of Plant Nutrition* 14, 1023-1034.

- Schwertmann, U., 1964. Differenzierung der Eisenoxide des Bodens durch Extraktion mit Ammoniumoxalat-Lösung. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 105, 194-202.
- Seidman, C.E., Struhl, K., Sheen, J., Jessen, T., 1997. Introduction of plasmid DNA into cells. *Current protocols in molecular biology*, 1.8. 1-1.8. 10.
- Senthil-Kumar, M., Gowda, H.R., Hema, R., Mysore, K.S., Udayakumar, M., 2008. Virus-induced gene silencing and its application in characterizing genes involved in water-deficit-stress tolerance. *Journal of plant physiology* 165, 1404-1421.
- Senthil-Kumar, M., Mysore, K.S., 2011. New dimensions for VIGS in plant functional genomics. *Trends in plant science* 16, 656-665.
- Senthil-Kumar, M., Mysore, K.S., 2014. Tobacco rattle virus-based virus-induced gene silencing in *Nicotiana benthamiana*. *nature protocols* 9, 1549-1562.
- Senthil-Kumar, M., Mysore, K.S., 2011. Virus-induced gene silencing can persist for more than 2 years and also be transmitted to progeny seedlings in *Nicotiana benthamiana* and tomato. *Plant biotechnology journal* 9, 797-806.
- Shi, R., Bäßler, R., Zou, C., Römheld, V., 2011. Is iron phloem mobile during senescence in trees? A reinvestigation of Rissmüller's finding of 1874. *Plant Physiology and Biochemistry* 49, 489-493.
- Siminis, C.I., Stavrakakis, M.N., 2008. Iron induces root and leaf ferric chelate reduction activity in grapevine rootstock 140 Ruggeri. *HortScience* 43, 685-690.
- Sperotto, R.A., Boff, T., Duarte, G.L., Santos, L.S., Grusak, M.A., Fett, J.P., 2010. Identification of putative target genes to manipulate Fe and Zn concentrations in rice grains. *Journal of plant physiology* 167, 1500-1506.
- Sperotto, R.A., Vasconcelos, M.W., Grusak, M.A., Fett, J.P., 2012. Effects of different Fe supplies on mineral partitioning and remobilization during the reproductive development of rice (*Oryza sativa* L.). *Rice* 5, 27.
- Takahashi, M., Terada, Y., Nakai, I., Nakanishi, H., Yoshimura, E., Mori, S., Nishizawa, N.K., 2003. Role of nicotianamine in the intracellular delivery of metals and plant reproductive development. *The Plant Cell* 15, 1263-1280.
- Tian, S.-L., Li, L., Chai, W.-G., Shah, S.N.M., Gong, Z.-H., 2014. Effects of silencing key genes in the capsanthin biosynthetic pathway on fruit color of detached pepper fruits. *BMC plant biology* 14, 1.
- Torun, A.A., Serce, S., Kacar, Y.A., Erdem, N., Erdem, H., Bicen, B., Tolay, I., 2013. Determination of factors affecting sensitivity of two strawberry species to iron deficiency. *International journal of food, agriculture and environment* 11, 785-789.
- Ueno, D., Rombola, A., Iwashita, T., Nomoto, K., Ma, J., 2007. Identification of two novel phytosiderophores secreted by perennial grasses. *New Phytologist* 174, 304-310.
- Valentine, T., Shaw, J., Blok, V.C., Phillips, M.S., Oparka, K.J., Lacomme, C., 2004. Efficient virus-induced gene silencing in roots using a modified tobacco rattle virus vector. *Plant Physiology* 136, 3999-4009.
- Valentinuzzi, F., Pii, Y., Vigani, G., Lehmann, M., Cesco, S., Mimmo, T., 2015. Phosphorus and iron deficiencies induce a metabolic reprogramming and affect the exudation traits of the woody plant *Fragaria ananassa*. *Journal of experimental botany* 66, 6483-6495.
- Vasconcelos, M., Eckert, H., Arahana, V., Graef, G., Grusak, M.A., Clemente, T., 2006. Molecular and phenotypic characterization of transgenic soybean expressing the *Arabidopsis* ferric chelate reductase gene, FRO2. *Planta* 224, 1116-1128.
- Vasconcelos, M.W., Gruissem, W., Bhullar, N.K., 2017. Iron biofortification in the 21st century: setting realistic targets, overcoming obstacles, and new strategies for healthy nutrition. *Current opinion in biotechnology* 44, 8-15.
- Velásquez, A.C., Chakravarthy, S., Martin, G.B., 2009. Virus-induced gene silencing (VIGS) in *Nicotiana benthamiana* and tomato. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, e1292-e1292.
- Venturas, M., Fernández, V., Nadal, P., Guzmán, P., Lucena, J.J., Gil, L., 2014. Root iron uptake efficiency of *Ulmus laevis* and *U. minor* and their distribution in soils of the Iberian Peninsula. *Frontiers in plant science* 5.

- Vert, G., Grotz, N., Dédaldéchamp, F., Gaymard, F., Guerinot, M.L., Briat, J.-F., Curie, C., 2002. IRT1, an Arabidopsis transporter essential for iron uptake from the soil and for plant growth. *The Plant Cell* 14, 1223-1233.
- Vigani, G., Morandini, P., Murgia, I., 2013. Searching iron sensors in plants by exploring the link among 2'-OG-dependent dioxygenases, the iron deficiency response and metabolic adjustments occurring under iron deficiency. *Frontiers in plant science* 4, 169.
- Vorwieger, A., Gryczka, C., Czihal, A., Douchkov, D., Tiedemann, J., Mock, H.-P., Jakoby, M., Weisshaar, B., Saalbach, I., Bäumlein, H., 2007. Iron assimilation and transcription factor controlled synthesis of riboflavin in plants. *Planta* 226, 147-158.
- Walker, E.L., Connolly, E.L., 2008. Time to pump iron: iron-deficiency-signaling mechanisms of higher plants. *Current opinion in plant biology* 11, 530-535.
- Walkley, A., Black, I.A., 1934. An examination of the Degtjareff method for determining soil organic matter and a proposed modification of the chromic acid titration method. *Soil Science* 37, 29-38.
- Waters, B.M., Blevins, D.G., Eide, D.J., 2002. Characterization of FRO1, a pea ferric-chelate reductase involved in root iron acquisition. *Plant Physiology* 129, 85-94.
- Waters, B.M., Lucena, C., Romera, F.J., Jester, G.G., Wynn, A.N., Rojas, C.L., Alcántara, E., Pérez-Vicente, R., 2007. Ethylene involvement in the regulation of the H⁺-ATPase CsHA1 gene and of the new isolated ferric reductase CsFRO1 and iron transporter CslRT1 genes in cucumber plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 45, 293-301.
- Wu, C., Jia, L., Goggin, F., 2011. The reliability of virus-induced gene silencing experiments using tobacco rattle virus in tomato is influenced by the size of the vector control. *Molecular plant pathology* 12, 299-305.
- Xia, Z., Su, X., Wu, J., Wu, K., Zhang, H., 2012. Molecular cloning and functional characterization of a putative sulfite oxidase (SO) ortholog from *Nicotiana benthamiana*. *Molecular biology reports* 39, 2429-2437.
- Xiong, Z.-T., Li, Y.-H., Xu, B., 2002. Nutrition influence on copper accumulation by *Brassica pekinensis* Rupr. *Ecotoxicology and environmental safety* 53, 200-205.
- Yuan, Y., Wu, H., Wang, N., Li, J., Zhao, W., Du, J., Wang, D., Ling, H.-Q., 2008. FIT interacts with AtbHLH38 and AtbHLH39 in regulating iron uptake gene expression for iron homeostasis in *Arabidopsis*. *Cell research* 18.
- Zhai, Z., Gayomba, S.R., Jung, H.-i., Vimalakumari, N.K., Piñeros, M., Craft, E., Rutzke, M.A., Danku, J., Lahner, B., Punshon, T., 2014. OPT3 is a phloem-specific iron transporter that is essential for systemic iron signaling and redistribution of iron and cadmium in *Arabidopsis*. *The Plant Cell Online* 26, 2249-2264.
- Zielińska-Dawidziak, M., 2015. Plant ferritin—a source of iron to prevent its deficiency. *Nutrients* 7, 1184-1201.
- Zocchi, G., De Nisi, P., Dell'Orto, M., Espen, L., Gallina, P.M., 2007. Iron deficiency differently affects metabolic responses in soybean roots. *Journal of experimental botany* 58, 993-1000.
- Zouari, M., Abadía, A., Abadía, J., 2001. Iron is required for the induction of root ferric chelate reductase activity in iron-deficient tomato. *Journal of plant nutrition* 24, 383-396.

ANEXOS
