



### UNIVERSITE D'ANTANANARIVO

### ÉCOLE DOCTORALE AGRICULTURE, ÉLEVAGE ET ENVIRONNEMENT

### THESE

Pour l'obtention du diplôme de Doctorat en Sciences Agronomiques

### Comprendre la variation génotypique dans la tolérance à la toxicité ferreuse du riz : mécanismes, stratégies d'atténuation et implications nutritionnelles

#### Par Toavintsoa RAJONANDRAINA

Date de soutenance : 28 juin 2024

Composition du jury :

<b>Lilia RABEHARISOA</b> , Professeur titulaire, ESSA-Université d'Antananarivo	Président du jury
Harilala ANDRIAMANIRAKA, Professeur, ESSA-Université	Rapporteur interne
Michael FREI, Professeur, Université Justus-Liebig de Giessen	Rapporteur externe
(Allemagne)	Evenineteur interne
IOVO RAFULIST, Professeur, LRI-Universite d'Antanananvo	Examinateur interne
Noronirina Victorine RAKOTOARISOA, Professeur, Faculté des Sciences- Université d'Antananarivo	Examinateur externe
Tantely RAZAFIMBELO, Professeur, LRI-Université d'Antananarivo	Co-directeur de thèse
Andry ANDRIAMANANJARA, Professeur, LRI-Université d'Antananarivo	Co-directeur de thèse
Guy KIRK, Professeur, Université de Cranfield (Royaume-Uni)	Co-directeur de thèse
Matthias WISSUWA, Professeur, Université de Bonn (Allemagne)	Co-directeur de thèse
<b>Tovohery RAKOTOSON</b> , Docteur, International Rice Research Institute (Vietnam)	Encadreur scientifique







Gold is for the mistress - silver for the maid-Copper for the craftsman cunning at his trade! " Good! " Said the Baron, sitting in his hall, But Iron - Cold Iron - is master of them all.

Rudyard Kipling, 1910

### Remerciements

C'est avec un immense plaisir que je présente les remerciements qui accompagnent l'aboutissement de ma thèse. Ce travail n'aurait pu voir le jour sans le soutien financier du projet "Mechanisms and genetics of iron toxicity tolerance in African rice" financé par le Biotechnology and Biological Sciences Research Council (Grant Ref. BB//R020388/1). Je tiens également à remercier le Laboratoire des RadioIsotopes (LRI) de l'Université d'Antananarivo pour m'avoir offert l'opportunité de mener à bien mes recherches dans un environnement scientifique stimulant.

Mes sincères remerciements s'adressent aux membres du jury qui ont accepté de rapporter et d'examiner mon travail : Lilia RABEHARISOA, Harilala ANDRIAMANIRAKA, Michael FREI, Tovo RAFOLISY, et Noronirina Victorine RAKOTOARISOA.

Je suis profondément reconnaissant envers mes équipes encadrantes pour leur soutien crucial tout au long de ma thèse. Mes directeurs de thèse, Tantely RAZAFIMBELO, Andry ANDRIAMANANJARA, Guy KIRK et Matthias WISSUWA, m'ont apporté une expertise et prodigué des conseils précieux, dont je leur suis infiniment reconnaissant. Je tiens à remercier tout particulièrement mon encadreur scientifique, Tovohery RAKOTOSON, dont l'expertise, les commentaires éclairés et la liberté qu'il m'a accordée m'ont permis de finaliser cette thèse avec succès.

Ce travail n'aurait pu être mené à bien sans la collaboration précieuse des techniciens et du personnel du Laboratoire des Radiolsotopes. Je tiens à remercier tout particulièrement Marie-Paule RAZAFIMANANTSOA pour sa disponibilité, son accueil et son écoute attentive tout au long de ces années de thèse. Je remercie également les doctorants accueillis au LRI pour leurs encouragements et les échanges enrichissants que nous avons eus. Ces interactions ont contribué à faire de cette expérience doctorale une période mémorable.

Je tiens à exprimer ma sincère gratitude à tous les agriculteurs du fokotany Ambatomafana, commune Sambaina, district Manjakandriana, région Analamanga qui ont participé aux expérimentations aux champs. Merci de m'avoir si chaleureusement accueilli. J'ai passé des moments exceptionnels à travailler avec vous, et votre engagement et votre aide ont été essentiels à la réussite des expérimentations menées !

À ma chère épouse, Riantsoa Tenompitia RAKOTOSON, et à mes merveilleux enfants, Anoka Hasinjaka RAJONANDRAINA et Rary To RAJONANDRAINA, Les mots ne suffisent pas pour exprimer ma profonde gratitude pour votre soutien indéfectible tout au long de mon parcours doctoral. Votre amour, votre patience et votre compréhension ont été ma source constante de motivation. Je suis infiniment reconnaissant pour vos sacrifices qui m'ont permis de me concentrer sur mes études. Cette réussite n'aurait pas été possible sans vous à mes côtés. Vous êtes ma plus grande fierté et mon inspiration.

Toavintsoa RAJONANDRAINA

## Résumé

La toxicité ferreuse est un facteur majeur limitant la production rizicole dans les rizières inondées ou irriguées, en raison de l'environnement anaérobie favorisant l'absorption excessive du fer ferreux (Fe<sup>2+</sup>) par le riz. Cela entraîne un brunissement des feuilles, un ralentissement de la croissance et une diminution du rendement lorsque les concentrations dépassent 300 mg kg<sup>-1</sup>. Touchant près de 18 % des zones rizicoles mondiales, cette toxicité peut provoquer des pertes de rendement allant jusqu'à 100 %, menaçant la sécurité alimentaire de milliards de personnes. Bien que la gestion de l'eau et des nutriments puisse partiellement atténuer ce problème, la sélection de génotypes tolérants offre une solution à long terme plus pratique. Malgré les avancées dans la recherche sur les mécanismes de tolérance, une lacune persiste dans l'application des résultats en milieu contrôlé aux conditions réelles au champ, principalement en raison de la négligence de l'exposition chronique à la toxicité ferreuse et de l'omission de facteurs complexes sur terrain. De plus, une compréhension exhaustive des interactions entre les éléments nutritifs et leur impact sur la toxicité ferreuse, ainsi que sur l'équilibre nutritionnel des différents génotypes de riz, demeure incomplète, nécessitant une investigation plus approfondie.

Le premier chapitre de cette étude visait à examiner les mécanismes de tolérance de différents génotypes de riz dans des conditions réelles au champ, en utilisant un sol riche en fer des Hautes Terres centrales de Madagascar. Une expérimentation sur deux ans avec six/sept génotypes a été réalisée, comprenant des échantillonnages répétés de tissus jeunes et âgés à différents stades de croissance des plantes de riz, ainsi que la mesure de la teneur en éléments nutritifs des tissus et l'évaluation des caractères phénotypiques du riz. Plusieurs mécanismes, dont l'importance relative varie selon les stades de croissance, contribuent à la tolérance à la toxicité ferreuse chez le riz. Des rendements en grains plus élevés étaient principalement attribuables à une croissance végétative saine, résultant soit d'une réduction de l'absorption du fer (exclusion), soit d'une minimisation de l'effet d'une absorption excessive par compartimentation du fer dans les tissus plus âgés et par la tolérance tissulaire (inclusion). Les mécanismes d'exclusion faiblissent au stade reproductif, entraînant une accumulation du fer dans la biomasse aérienne. Cependant, les génotypes tolérants maintiennent une bonne croissance grâce à une combinaison de compartimentation du fer et de tolérance tissulaire, permettant un remplissage des grains sans entrave majeure. Les concentrations en phosphore (P) et en potassium (K) tissulaires étaient proches ou inférieurs aux seuils de carence tout au long de la croissance. Bien que l'exclusion du Fe<sup>2+</sup> par oxydation dans la rhizosphère puisse limiter l'accès des ions P et K aux racines, les variations dans leurs concentrations tissulaires étaient minimes par rapport aux écarts de croissance. Ainsi, il est probable que les taux de croissance aient été le principal facteur influençant les différences d'absorption, avec les réponses à la toxicité ferreuse comme principale contrainte. Le rendement en grains n'était pas corrélé aux symptômes visuels. Pour une sélection précise, il faut élaborer des protocoles de criblage capturant les mécanismes de tolérance, en tenant compte de leur variabilité selon le stade de croissance et de leurs interactions avec d'autres facteurs comme la nutrition minérale. Bien que la sélection basée sur les symptômes visuels puisse aider dans l'étude de mécanismes spécifiques, elle reste trop simpliste. Dans ce chapitre, des génotypes prometteurs ont été identifiés : KA-28 pour une compartimentation et une tolérance tissulaire efficaces du fer, L-43 pour l'exclusion du fer et Tsipala pour la

tolérance malgré une sensibilité visuelle. Ces génotypes représentent de précieuses ressources génétiques pour la poursuite des recherches.

Le deuxième chapitre a étudié l'effet du magnésium (Mg) sur la tolérance à la toxicité ferreuse. Une expérimentation a été réalisée sur sept génotypes de riz présentant des degrés variables de tolérance à la toxicité ferreuse, utilisant un dispositif expérimental en split-plot comprenant huit traitements d'engrais, sept variétés et quatre répétitions. Les symptômes foliaires de toxicité ferreuse (brunissement) ont été évalués visuellement tout au long des stades de croissance, tandis que les parties aériennes ont été prélevées à différents moments pour une analyse minérale du fer, du Mg et du K. L'apport de Mg a significativement atténué les brunissements, sans affecter le rendement en biomasse ou en grains, tandis que celui de K, bien qu'il n'ait eu aucun effet sur les brunissements, a entraîné une augmentation significative de la biomasse aérienne et du rendement en grains. Ces résultats suggèrent que le Mg diminue la toxicité ferreuse sans affecter directement la croissance, tandis que le K a un effet inverse. De plus, les plantes traitées au Mg présentaient généralement des concentrations en fer plus faibles dans leur biomasse aérienne, ce qui suggère une exclusion renforcée au niveau de la plante entière. Cependant, l'analyse de plusieurs génotypes a montré que les symptômes de la toxicité ferreuse étaient également atténués sans diminution concomitante de la concentration en fer, suggérant qu'un apport accru en Mg confère une tolérance au niveau tissulaire. Ce chapitre fournit des indices pour atténuer le brunissement des feuilles induit par la toxicité ferreuse chez le riz.

Le dernier chapitre de cette étude a évalué l'état nutritionnel de différents génotypes de riz présentant des mécanismes de tolérance variés à la toxicité ferreuse. Pour ce faire, six/sept génotypes de riz a été cultivé pendant deux ans dans un champ fortement affecté par la toxicité ferreuse. Le taux d'absorption des nutriments, leur concentration ainsi que le ratio nutriments/fer ont été mesurés à différents stades de croissance. Pendant le stade végétatif, les génotypes à mécanisme d'exclusion favorisent des ratios nutriment/fer élevés en limitant l'absorption du fer, tandis que les génotypes à mécanisme d'inclusion (tolérants et sensibles) privilégient une acquisition globale des nutriments, y compris le fer, ce qui entraîne des ratios plus faibles. Ces stratégies assurent une production de biomasse adéquate pendant cette période. Cependant, au stade reproductif, les génotypes sensibles à mécanisme d'inclusion accusent une absorption réduite des nutriments autres que le fer, fragilisant leur résilience et entraînant une biomasse et un rendement inférieurs. En contraste, les génotypes tolérants maintiennent ou augmentent l'absorption globale des nutriments, garantissant une production efficace de biomasse et de rendement. Malgré des profils nutritionnels comparables, les génotypes tolérants à mécanisme d'inclusion présentent systématiquement une absorption accrue en calcium (Ca) et en zinc (Zn), ainsi que des ratios Ca/Fer et Zn/Fer supérieurs à ceux des génotypes sensibles à mécanisme d'inclusion. Ceci suggère un rôle potentiel de ces éléments dans la tolérance à la toxicité ferreuse. Les corrélations faibles à modérées observées entre les caractéristiques du riz et l'état nutritionnel mettent en lumière l'influence de facteurs additionnels, notamment pour la prédiction du rendement, soulignant ainsi l'importance de prendre en considération le stade de croissance. Deux points clés ressortent de cette étude pour renforcer la résilience du riz à la toxicité ferreuse : (i) sélection ciblée : comprendre les mécanismes de tolérance à chaque stade quide les programmes de sélection variétale, visant des ratios nutriment/fer efficaces pendant le stade végétatif et une absorption globale robuste des nutriments pendant les stades reproductifs. (ii) agriculture intelligente : une fertilisation ciblée basée sur les mécanismes de tolérance des génotypes et le stade de croissance du riz optimise l'équilibre nutritionnel et le potentiel de rendement.

### Abstract

Iron (Fe) toxicity is a major constraint to global rice production, causes severe yield losses (up to 100%) in nearly 18% of rice-growing areas. It occurs in submerged paddy soils because the biogeochemical changes following submergence cause large increases in the concentration of ferrous iron (Fe<sup>2+</sup>) in the soil solution. This readily available Fe<sup>2+</sup> is then excessively taken up by rice plants, leading to a toxicity and a series of detrimental effects such as leaf bronzing, stunted growth, and ultimately, yield losses. While water and nutrient management strategies can alleviate Fe toxicity to some extent, using tolerant genotypes offers a more practical long-term solution. However, translating research on tolerance mechanisms from controlled environments to real fields remains challenging due to two key factors: neglecting the chronic effects of Fe toxicity and omitting complex field-based factors. Additionally, a comprehensive understanding of nutrient interactions with Fe toxicity and the nutrient balance of different rice genotypes is still incomplete, requiring further investigation.

The first chapter of this study aimed to investigate the tolerance mechanisms in a diverse set of genotypes under field conditions in a highly Fe toxic soil in the Central Highlands of Madagascar. We made repeated plant samplings of young and old tissues throughout the growth period until maturity. Multiple mechanisms were involved, and the importance of different mechanisms changed between growth stages. Higher grain yields were mainly due to healthy vegetative growth, achieved either by reducing Fe uptake (exclusion) or by minimizing the effect of excess uptake through compartmentalization in older tissues and tissue tolerance. Exclusion mechanisms were relaxed during reproductive growth, leading to increased Fe accumulation in shoots. But tolerant genotypes were nonetheless able to grow well through a combination of Fe compartmentalization and tissue tolerance, so that grain filling could proceed relatively unimpeded. Tissue phosphorus (P) and potassium (K) concentrations were close to or below deficiency limits throughout growth. Exclusion by Fe<sup>2+</sup> oxidation in the rhizosphere will impede access of P and K ions to roots, but the differences in their tissue concentrations were much smaller than differences in growth rates, so growth rates evidently drove the uptake differences and responses to Fe toxicity were the more important constraints. There was no relation between grain yield and visual symptoms. To identify useful donors and markers for breeding it is important to develop screening protocols that capture the individual tolerance mechanisms, allowing for the effects of growth stage on their relative importance and expression, and possible interactions with other factors such as mineral nutrition. Selection for tolerance based on visual symptoms, particularly at the seedling stage, is overly simplistic, though it can be useful in the study of specific tolerance mechanisms. This chapter identified candidate donors for efficient Fe compartmentalization and tissue tolerance (KA-28), for Fe exclusion (L-43) and for tolerance despite appearing sensitive (Tsipala). Further physiological and genetic studies should investigate underlying causes and genetic factors in these with a view to identifying markers and genes for pyramiding in broadly tolerant genotypes.

In chapter two, we investigated the effect of magnesium (Mg) on Fe toxicity tolerance in field study. This involved conducting a field experiment with seven rice genotypes differing in their tolerance mechanism to Fe toxicity. We used a split-plot design with eight fertilizer treatments, encompassing seven rice genotypes and four replicates. Addition of Mg consistently decreased leaf bronzing without affecting biomass or grain yield. In contrast, K application, while not affecting bronzing, significantly increased aboveground biomass and grain yield.

These results suggest Mg alleviates Fe toxicity without impacting growth, while K has the opposite effect. Plants treated with Mg tended to have smaller shoot Fe concentrations, suggesting enhanced exclusion at the whole-plant level. However, analysis of multiple genotypes showed that Fe toxicity symptoms were also mitigated without a concomitant decrease of Fe concentration, suggesting that increased Mg supply confers tolerance at the tissue level. This study provides clues for mitigating Fe toxicity-induced leaf bronzing in rice.

The last chapter of this study assessed the nutrient status of rice genotypes with different tolerance mechanisms to Fe toxicity. A set of seven lowland rice genotypes were grown in a highly Fe toxic field. Nutrient uptake rate and concentrations, along with nutrient-to-Fe ratio at different growth stages were determined. During vegetative growth, excluder genotypes prioritize high nutrient-to-Fe ratios through restricted Fe uptake, while includers (tolerant and sensitive) maximize overall nutrient acquisition, including Fe, resulting in lower ratios; both strategies ensure sufficient biomass production. In reproductive growth, sensitive-includers exhibited reduced non-Fe nutrient uptake, compromising resilience, and leading to lower biomass and yield. At the same time, tolerant genotypes (includer and excluder) maintain or enhance overall nutrient uptake, safeguarding efficient biomass and yield production. Despite similar nutrient status patterns, tolerant-includers consistently exhibit higher calcium (Ca) and zinc (Zn) uptake, along with elevated Ca/Fe and Zn/Fe ratios compared to sensitive-includers, suggesting potential roles in Fe tolerance. Moderate to weak correlations between rice traits and nutrient status highlight the influence of additional factors, particularly in yield prediction, underscoring the importance of stage-specific consideration. The study provided valuable insights into the complex interplay between nutrient status, Fe toxicity tolerance mechanisms, and rice genotype performance, which are crucial for rice cultivation in Fe-toxic environments and for advancing our understanding of nutrient management in crop production.

# Table des matières

Remerciem	ients	I
Résumé		II
Abstract		IV
Table des n	natières	VI
		······································
Listes des	sigles, des abreviations et des acronymes	X
Listes des	figures	XII
Listes des	tableaux	XIV
Introductio	n générale et objectifs	1
1. Intro	duction	1
2. Facto	eurs pédologiques favorisant la toxicité ferreuse	2
2.1.	La nature de la roche-mère et la minéralogie des argiles	2
2.2.	Condition de sol submergé et potentiel d'oxydo-réduction	3
2.3.	Le pH du sol	3
2.4.	Faible fertilité du sol et teneur en matière organique	4
3. Le fe	r dans les plants de riz	4
3.1.	Les rôles essentiels du fer chez les plantes	4
3.1.1	. La synthèse de chlorophylle	4
3.1.2	. La photosynthèse	4
3.1.3	. Respiration	5
3.1.4	Le cycle de l'azote	5
3.2.	Absorption, transport et stockage du fer chez le riz	5
3.2.1	. Absorption du fer : une approche hybride	5
3.2.2	. Le transport du fer : de la racine vers la biomasse aérienne	7
3.2.3	. Le stockage du fer dans le riz	7
3.3.	Effet de la toxicité ferreuse sur les plants de riz	8
3.4.	Adaptation du riz à la toxicité ferreuse	10
3.4.1	. Mecanismes racinaires	10
3.4	4.1.1. Exclusion du fer	10
3.4	1.1.2. Rétention du fer	11
3.4.2	. Mecanismes caulinaires et foliaires	11
3.4	1.2.1. Compartimentation du fer	11

3.4	4.2.2. Tolérance tissulaire : détoxification des ROS	12
4. Stra	tégie de gestion agronomique pour contrôler la toxicité ferreuse	13
4.1.	Gestion de l'eau	13
4.2.	Gestion du sol	13
5. Rôle	d'autres éléments nutritifs sur la toxicité ferreuse	14
5.1.	Phosphore	14
5.2.	Potassium	15
5.3.	Calcium et magnesium	15
5.4.	Silicium (Si)	16
6. Lacı	unes de connaissances, objectifs et plan de thèse	16
Mechanisn	ns of genotypic differences in tolerance of iron toxicity in field-grown right	ce*
		18
Résumé	étendu	18
1. Intro	oduction	20
2. Mate	erials and methods	21
2.1.	Genotypes	21
2.2.	Experimental set up	21
2.3.	Plant measurements	22
2.4.	Data analysis	23
3. Res	ults	23
3.1.	Genotypic differences during vegetative growth	24
3.2.	Partitioning between shoot tissues during vegetative growth	26
3.3.	Genotypic differences during reproductive growth and at maturity	28
3.4.	Partitioning between shoot tissues during reproductive growth	29
3.5.	P and K uptake during vegetative and reproductive growth	31
3.6.	Relationships with grain yield	32
4. Disc	ussion	35
4.1.	Exclusion, compartmentalization and other tolerance mechanisms	35
4.2.	Changes between growth stages	36
4.3.	Interactions with mineral nutrition	37
4.4.	Implications for rice breeding	38
5. Con	clusions	38
Magnesiur	n supply alleviates iron toxicity-induced leaf bronzing in rice through	
exclusion	and tissue-tolerance mechanisms <sup>*</sup>	40
Résumé	étendu	40

1	. Intro	oduction	42
2	. Mate	erials and methods	43
	2.1.	Experimental setup	43
	2.2.	Sampling and measurements	44
	2.3.	Mineral analysis	44
	2.4.	Data analysis	44
3	. Res	ults	45
	3.1.	Effects of K and Mg on rice traits	45
	3.2.	Mg effect on shoot Fe uptake and Fe concentrations in different tissu	<b>ies</b> . 46
4	. Disc	ussion	49
	4.1.	Fe exclusion mechanisms conferred by Mg supply	49
	4.2.	Mg-induced tissue-tolerance mechanisms	50
	4.3.	Beneficial effects of Mg on mineral stresses	51
5	. Con	clusions and future perspectives	51
Nut me	rient st chanisr	atus affected by iron toxicity of rice genotypes with different tolerance	<b>)</b> 52
R	lésumé	étendu	52
1	. Intro	oduction	54
2	. Mate	erials and methods	55
	2.1.	Experimental site and genotype	55
	2.2.	Experimental setup	55
	2.3.	Plant sampling, measurements, and mineral analysis	56
	2.4.	Data analysis	56
3	. Res	ults	57
	3.1. mecha	Differences in rice traits associated with iron toxicity tolerance	57
	3.2.	Nutritional status during vegetative growth	57
	3.3.	Nutritional status during reproductive growth	60
	3.4.	<b>Relationship between Fe and other nutrients throughout the growth</b> s	stage
	3.5.	Variable explaining LYS, LBS, shoot biomass, and grain yield	63
4	. Disc	ussions	64
	4.1.	Nutritional status in vegetative stage: Unveiling the trade-offs of excl	usion
	and in	clusion mechanisms	64
	4.2.	Nutrient status in reproductive stage	64
	4.3.	Potential roles of Ca and Zn in tolerant-includer genotypes	65

	4.4. toxic	From leaf symptoms to yield: a complex interplay of nutrient st ity	atus and Fe 66
5	5. Co	nclusion	66
Dis	cussio	on générale, conclusion, et perspectives de recherche future	
1	. Mé	canismes polyfactoriels de tolérance contre la toxicité ferreuse	
2 c	2. Str Iéveloj	atégies de tolérance du riz contre la toxicité ferreuse dépendant o ppement	<b>lu stade de</b> 70
3	s. Sy	mptômes foliaires : Au-delà d'un simple indicateur	70
4	. Po	int fort et limites de l'étude	70
5	. Pe	rspectives de recherche future	71
Ré	férenc	es bibliographiques	74
AN	NEXE	(appendix)	

# Listes des sigles, des abréviations et des acronymes

AAS	Atomic Absorption Spectrometry
ADN	Acide désoxyribonucléique
AGNES	Agglomerative Nesting Hierarchical clustering
ALA	Acide δ-aminolévulinique
ANOVA	Analysis of Variance
ARN	Acide ribonucléique
AsA	Ascorbate
ATP	Adenosine triphosphate
В	Booting
С	Carbon
Ca	Calcium
CA	Acide caféique
CAT	Catalase
CEC	Capacite d'échange cationique
Cu	Cuivre
DC	Centre de discrimination
d	Days
DHAR	Dehydroascorbate reductase
DMA	Acide désoxymugineique
DMAS	Désoxymugineic acid synthase
DW	Dry Weight
F	Flowering
Fe	Iron
FL	Flag leaf
FRO	Ferricchélate réductase
GSNOR	S-nitrosoglutathion reductase
GWAS	Genome-Wide Association Study
HSD	Honestly Significant Differences
ICP-MS	Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry
K	Potassium
LBS	Leaf bronzing score
LYS	Leaf yellowing score
MA	Acide mugineique
MAS	Marker assisted selection
MDA	Malondialdehyde
MDHAR	Monodenydroascorbate reductase
Mg	Magnesium
ML	Middle leaves
MN	Manganese
N	Azote (Nitrogen)
NAS	
NAAI	Nicotianamine aminotransterase
NKAMP	Proteines associees a la resistance naturelle des macrophages
USAKI	Activated protein kinases

OsFER	Ferritin gene
OsFRDL	Ferric reductase defective like
OsIRT	Transporteur régulé par le fer
OsPEZ	Canal d'efflux des phénols zéro
OsTOM	Transporteur d'acide mugineique
OsVIT	Transporteurs vacuolaires du fer
OsYLS	Yellow strike-like
Р	Phosphore (Phosphorus)
PCA	Acide protocatéchuïque
PN	Panicles
POD	Péroxidase
PSI	Photosystème I
PSII	Photosystème II
QTL	Quantitative Trait Loci
ROS	Espèce réactive de l'oxygène (Reactive Oxygen Species)
S	Sulfure
Si	Silicium
SSA	Sub-Saharan Africa
ST	Stem/leaf sheath
SDW	Shoot Dry Weight
SOD	Superoxide dismutase
YL	Youngest leaf
Yr	Year
Zn	Zinc

## Listes des figures

Figure 1: Schéma combiné des stratégies I et II d'absorption du fer par les racines du riz...6

**Figure 3:** Vegetative stage data for genotypes classified as Fe 'includers' and 'excluders': (A) shoot Fe concentration (sum of individual tissue contents divided by whole shoot DW), (B) shoot DW, (C) shoot Fe content, (D) leaf bronzing score, (E) shoot Fe uptake rate and (F) shoot growth rate. A–D are at booting stage; E–F are from transplanting to booting. Data are means ± standard errors (n = 4). Common letters indicate no significant difference by Tukey's HSD test.

**Figure 5:** Reproductive stage data: (A) shoot Fe concentration, (B) shoot DW, (C) shoot Fe content, (D) leaf bronzing score, (E) shoot Fe uptake rate and (F) shoot growth rate. A, B, C are at maturity; D is at flowering; E–F are from booting to maturity. Data are means ± standard errors (n = 4). Common letters indicate no significant difference by Tukey's HSD test. ...... 29

**Figure 14:** Plant nutritional status at vegetative stage: (A) nutrient uptake rate, (B) nutrient concentration, (C) nutrient:Fe concentration ratio. A is from transplanting to booting; B and C are at booting stage. Common letters indicate no significant difference by Tukey's HSD test.

**Figure 15:** Plant nutritional status at reproductive stage: (A) nutrient uptake rate, (B) nutrient concentration, and (C) nutrient:Fe concentration ratio. A is from booting to maturity; B and C are at flowering stage. Common letters indicate no significant difference by Tukey's HSD test.

### Listes des tableaux

 Table 2: Rice genotypes used in the study, their origin, their putative response to iron toxicity based on past research (Rakotoson et al., 2019) and a preliminary screening at field sites in Madagascar (Materials and methods), and grain yields in the experiments reported here. Data are means of 4 replicates. Similar letters in a column indicate no significant difference by HSD-test.

 21

 Table 6: List of rice genotypes used in the study
 44

 Table 7: ANOVA results on the effect of genotype, P, Mg and K on Fe toxicity-related traits

 45

**Table 8:** Rice genotypes used in the study, their origin, and their tolerance mechanisms basedon past research.55

 Table 9: Differences in rice traits respond to Fe toxicity tolerance mechanisms at vegetative and reproductive stages. Values for "Includer" and "Excluder" are means of 16 and 20 replicates, respectively. Similar letters in a column indicate no significant difference by HSD-test. LYS= leaf yellowing score (0-10 scale), LBS= leaf bronzing score (0-10 scale), SDW= shoot dry weight.

## Introduction générale et objectifs

#### 1. Introduction

Le riz (*Oryza sativa* L.), aliment de base pour des milliards de personnes, joue un rôle essentiel dans la sécurité alimentaire mondiale, contribuant à hauteur de 27 % à notre apport quotidien en calories. Au cours des cinq dernières décennies, la production rizicole a triplé pour répondre à la demande croissante, atteignant plus de 503 millions de tonnes par an (Timmer et *al.*, 2015). Cependant, avec une population prévue de 9,1 milliards d'habitants d'ici 2050, une augmentation supplémentaire de la production de 100 millions de tonnes est essentielle pour garantir la sécurité alimentaire (Samal et *al.*, 2022). Malheureusement, la réalisation de cet objectif se heurte à de nombreux défis, notamment le changement climatique avec son réchauffement et ses régimes de précipitations imprévisibles, ainsi que des stress abiotiques tels que la toxicité ferreuse.

Émergeant comme une menace majeure pour la riziculture, la toxicité ferreuse affecte près de 18 % des zones rizicoles mondiales, entraînant des pertes de rendement allant de 12 à 100 %, selon la gravité (Mahender et *al.*, 2019 ; Sahrawat, 2004). Cela se traduit par des pertes potentielles de millions de tonnes de riz par an, mettant en péril la sécurité alimentaire mondiale.

Le fer, bien qu'étant le quatrième élément le plus abondant dans le sol, se trouve principalement sous des formes oxydées insolubles, limitant ainsi son assimilation par les plantes. Ce paradoxe apparent souligne le rôle essentiel, mais ambigu, du fer dans le riz. Indispensable à la croissance et au développement des végétaux, le fer devient néfaste en cas d'excès. Participant à des processus biologiques clés tels que la synthèse de la chlorophylle, la photosynthèse et la respiration, la présence du fer est vitale pour la santé des plants de riz (Miller et *al.*, 1982; Ning et *al.*, 2023; Trncik et *al.*, 2023; Weinstein & Robbins, 1955). Ces fonctions soulignent l'importance de maintenir des niveaux optimaux de fer afin d'assurer une croissance vigoureuse du riz et, *in fine*, des récoltes abondantes.

Le sol constitue la principale source de fer pour les plantes. Dans les rizières inondées, les conditions submergées favorisent la réduction du fer ferrique (Fe<sup>3+</sup>) en fer ferreux (Fe<sup>2+</sup>) (Ponnamperuma, 1972). Lorsque les concentrations de Fe<sup>2+</sup> dans la solution du sol dépassent 300 mg L<sup>-1</sup>, une toxicité se manifeste (Dobermann & Fairhurst, 2000). Cette toxicité affecte significativement la culture du riz dans diverses régions, notamment au Brésil, en Chine, en Indonésie, en Malaisie, aux Philippines, en Thaïlande et en Afrique de l'Ouest (Becker & Asch, 2005 ; Mahender et *al.*, 2019), entraînant l'abandon de centaines d'hectares de terres en raison de la toxicité ferreuse (Chérif et *al.*, 2009). À Madagascar seulement, environ 27 % (97 750 ha) des zones rizicoles sont potentiellement touchées par la toxicité ferreuse (van Oort, 2018).

L'augmentation de la disponibilité de Fe<sup>2+</sup> dans la zone racinaire est une condition préalable à la toxicité ferreuse chez les plants de riz. Cet excès de Fe<sup>2+</sup> doit ensuite être absorbé par les racines et transporté vers la partie aérienne par le xylème. Une fois dans la partie aérienne, le taux élevé de fer déclenche la réaction de Fenton/Haber-Weiss, générant des radicaux libres nocifs qui endommagent les protéines, les lipides et l'ADN (Dumanović et *al.*, 2021 ; Mittler, 2017). Au niveau cellulaire, cet excès de fer perturbe la membrane cellulaire et réduit l'activité métabolique, y compris la photosynthèse. Ces effets néfastes se manifestent par le "brunissement" caractéristique des feuilles de riz (Howeler, 1973), conduisant finalement à une diminution du rendement rizicole (Becker & Asch, 2005).

Cette revue se penche sur la complexité de la toxicité ferreuse chez les plants de riz, en examinant les dynamiques multiformes du fer, à la fois dans le sol et dans les plantes ellesmêmes, qui contribuent à sa toxicité. Nous explorons ensuite des stratégies de gestion agronomique potentielles pour atténuer ce stress critique et étudions comment d'autres nutriments influencent la sévérité de la toxicité ferreuse. En acquérant une compréhension globale de ces facteurs, nous visons le développement de stratégies efficaces pour assurer une production durable de riz.

#### 2. Facteurs pédologiques favorisant la toxicité ferreuse

Plusieurs facteurs peuvent influencer la disponibilité du fer dans la rhizosphère et le sol, conduisant potentiellement à une toxicité ferreuse en favorisant l'absorption excessive de fer supérieure aux besoins de la plante. Les principaux contributeurs sont la nature de la rochemère et la minéralogie des argiles, la submersion et les variations du potentiel d'oxydoréduction, un pH acide du sol, ainsi qu'une faible fertilité du sol et la teneur en matière organique.

#### 2.1. La nature de la roche-mère et la minéralogie des argiles

La nature de la roche-mère et la minéralogie de l'argile influencent la disponibilité du fer dans les rizières, pouvant potentiellement exacerber la toxicité ferreuse. Différents minéraux de fer communément rencontrés dans les sols contribuent à son abondance, chacun ayant des propriétés et une répartition unique (Shivay & Mandi, 2020). La goethite (FeOOH) et l'hématite (Fe2O3) sont répandues dans les sols bien aérés et bien drainés. La sidérite (FeCO<sub>3</sub>) prospère dans un environnement anaérobie, tandis que la ferrihydrite (FeOOH•nH<sub>2</sub>O), en raison de sa forte réactivité, contribue de manière significative à la disponibilité du fer dans les jeunes sols. La lépidocrocite ( $\gamma$ -FeOOH) est spécifique à certains types de sols. La pyrite (FeS<sub>2</sub>) et la magnétite (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) sont moins courantes dans les sols, se trouvant généralement dans des contextes géologiques particuliers.

La teneur en argile joue également un rôle crucial, principalement en raison de son impact sur la rétention du fer. Les argiles à forte capacité d'échange cationique (CEC), comme les smectites, peuvent séquestrer davantage de fer, ce qui réduit potentiellement son absorption par le riz et atténue la toxicité ferreuse. À l'inverse, les sols dominés par des argiles à faible CEC, comme la kaolinite, permettent une mobilisation et une absorption plus faciles du fer, ce qui peut exacerber la toxicité ferreuse (Prade et *al.*, 1990). Comprendre à la fois les types de minéraux et la composition argileuse des rizières est donc crucial pour gérer et atténuer la toxicité ferreuse.

#### 2.2. Condition de sol submergé et potentiel d'oxydo-réduction

La toxicité ferreuse dans les sols, en particulier les rizières, a pour condition préalable la submersion, qui entraîne un épuisement rapide de l'oxygène en 6 à 10 heures (Fageria et *al.*, 2011). Ce passage à des conditions anaérobies élimine les microbes aérobies tout en favorisant les anaérobies qui utilisent des accepteurs d'électrons alternatifs pour oxyder les composés organiques (CH<sub>2</sub>O). L'épuisement en oxygène déclenche une réduction séquentielle et thermodynamiquement induite des accepteurs d'électrons pour la respiration microbienne, commençant par l'oxygène et passant par le nitrate (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), les oxydes de manganèse (MnO<sub>2</sub>), le fer (Fe<sup>3+</sup>) et enfin le sulfate (SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) (Tableau 1) (Fageria et *al.*, 2011 ; Patrick et *al.*, 1985).

Tableau 1:Séquence thermodynamique des processus de réduction dans les sols submergé



En l'absence d'oxygène, le Fe<sup>3+</sup> devient le principal accepteur d'électrons en raison de son abondance relative aux autres. L'oxygène et le  $NO_3^-$  s'épuisent rapidement dans les heures ou les jours qui suivent la submersion, suivis de la réduction rapide du  $MnO_2$  en raison de la faible teneur du sol en Mn. Par la suite, entre 1% et 20% des oxydes de fer libres dans le sol sont réduits en Fe<sup>2+</sup> sur une période de 1 à 2 mois d'immersion.

#### 2.3. Le pH du sol

Le pH du sol joue un rôle crucial dans la solubilité du fer et son absorption par les plantes. Il fluctue souvent en raison des processus qui se déroulent dans le sol et qui impliquent les plantes et les micro-organismes. À mesure que le pH augmente, le fer se convertit principalement en formes moins solubles, comme l'oxyde de fer (Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) et l'hydroxyde de fer (Fe(OH)<sub>3</sub>). En revanche, l'acidification modifie l'équilibre et favorise la libération d'ions Fe<sup>3+</sup> solubles. Par conséquent, la toxicité ferreuse est plus importante dans les sols acides que dans les sols alcalins (Fageria et *al.*, 2008).

La submersion du sol modifie son pH. Elle l'augmente dans les sols acides par des processus de réduction et le diminue dans les sols alcalins par l'accumulation de  $CO_2$ . À mesure que la réduction se poursuit après la submersion, le pH tend à augmenter car les ions H<sup>+</sup> sont consommés. Simultanément, le  $CO_2$  est produit et s'accumule à des pressions partielles élevées en raison de sa lente évacuation du sol. Cette accumulation de  $CO_2$  a un double effet : elle abaisse le pH dans les sols alcalins tout en modérant l'augmentation du pH dans les sols

acides, conduisant à une convergence du pH du sol autour de 6,5-7 après la submersion (Kirk et *al.*, 2022).

#### 2.4. Faible fertilité du sol et teneur en matière organique

Dans les sols fertiles, les nutriments abondants tels que le phosphore (P), le manganèse (Mn) et le zinc (Zn) entrent en compétition avec le fer pour son absorption par les plants de riz. Cette compétition peut limiter l'absorption du fer, même s'il est présent en quantité suffisante dans le sol (Tadano & Tanaka, 1970). À l'inverse, un sol pauvre en éléments nutritifs réduit la compétition pour le fer, ce qui peut entraîner une absorption et une accumulation excessives du fer, provoquant ainsi une toxicité.

De plus, les sols pauvres en éléments nutritifs ont souvent une teneur plus faible en matière organique, ce qui a un effet contradictoire sur la disponibilité du fer. D'une part, une faible teneur en matière organique diminue le nombre de sites de fixation du fer, ce qui augmente la quantité de fer dissous dans la solution du sol et le rend plus accessible aux plantes. D'autre part, la décomposition de la matière organique dans des conditions de faible fertilité et de submersion peut libérer le fer lié dans la solution du sol, contribuant encore à l'augmentation de la disponibilité du fer (Patrick, 1981).

#### 3. Le fer dans les plants de riz

#### 3.1. Les rôles essentiels du fer chez les plantes

Le fer, élément vital des protéines et des enzymes, joue un rôle central dans des processus biologiques clés tels que la synthèse de la chlorophylle, la photosynthèse, la respiration et la fixation de l'azote (N).

#### 3.1.1.La synthèse de chlorophylle

Les plantes ont besoin du fer pour de nombreuses fonctions, son rôle dans la synthèse de la chlorophylle étant particulièrement crucial. Environ 80 % du fer cellulaire présent dans la plupart des feuilles de plantes se situe dans les chloroplastes. Plus précisément, 60 % de ce fer est localisé dans la membrane thylacoïde, 20 % dans le stroma chloroplastique et seule une infime fraction est présente dans les autres parties de la plante (Finazzi et *al.*, 2015; Ning et *al.*, 2023).

Le fer régule le taux de formation de l'acide  $\delta$ -aminolévulinique (ALA), la première étape cruciale de la biosynthèse de la chlorophylle (Miller et *al.*, 1982). L'ALA agit comme précurseur des porphyrines, elles-mêmes précurseurs de la chlorophylle et d'autres pigments végétaux (Wu Y. et *al.*, 2019). Un niveau adéquat d'ALA est essentiel à la production de chlorophylle. En cas de carence en fer, la synthèse d'ALA est fortement entravée, ce qui conduit finalement à une diminution de la teneur en chlorophylle dans les feuilles. Cette carence se manifeste par la chlorose, une coloration jaunissante des feuilles due à l'absence du pigment vert chlorophyllien.

#### 3.1.2.La photosynthèse

L'appareil photosynthétique contient 21 à 22 atomes de fer par chaîne de transport d'électrons. Ces atomes se trouvent dans des protéines contenant des groupes hémiques et des clusters fer-soufre (Fer-S) (Briat et *al.*, 2007). Plus précisément, on retrouve en général

deux ou trois atomes de fer dans les molécules directement liées au photosystème II (PS-II), 12 dans le photosystème I (PS-I), cinq dans le complexe du cytochrome et deux dans la ferrédoxine (Varotto et *al.*, 2002). Cette répartition du fer souligne son implication directe dans la photosynthèse des plantes, et donc dans leur productivité (Briat et *al.*, 2007).

Des études ont montré que le fer affecte la photosynthèse des plantes de trois manières principales (Ning et *al.*, 2023). Premièrement, le fer influence la production de cystoïdes à l'intérieur des chloroplastes. On pense que les cystoïdes jouent un rôle dans le stockage et la régulation du fer, pouvant ainsi impacter indirectement la photosynthèse. Deuxièmement, le fer forme divers complexes avec l'oxygène, notamment le complexe de la cytochrome C oxydase, la Fer-oxygène réductase et l'hème, qui interviennent dans le processus des réactions photochimiques chez les plantes. Troisièmement, le fer joue un rôle central dans le transfert d'électrons. Les protéines contenant du fer, comme les cytochromes et le complexe Fer-chlorophylle du PSII, facilitent le transfert efficace des électrons, contribuant ainsi au final à la génération de molécules énergétiques qui alimentent diverses fonctions cellulaires, dont la photosynthèse.

#### 3.1.3. Respiration

Le fer joue un rôle crucial dans la respiration des plantes par son implication dans divers processus cellulaires. En tant que composant fondamental de plusieurs enzymes clés de la respiration, telles que les cytochromes, la catalase (CAT) et la péroxidase (POD), il est essentiel à la chaîne de transport d'électrons dans ce processus (Weinstein & Robbins, 1955). Une carence en fer affaiblit ces enzymes, entravant le transfert d'électrons et réduisant la synthèse d'ATP, ce qui a un impact négatif sur la respiration de la plante.

De plus, le fer agit comme cofacteur pour plusieurs enzymes du cycle de Krebs, y compris la cis-aconitase (Broderick, 2004). Une carence en fer inhibe l'activité de ces enzymes, pouvant ainsi affecter l'efficacité du cycle et altérer la régulation de la respiration. Au-delà des enzymes, les protéines Fer-S jouent un rôle crucial dans le transport d'électrons à l'intérieur des cellules végétales. Une carence en fer peut perturber leur activité, entravant le transfert d'électrons, réduisant la production d'ATP et impactant finalement la croissance et le métabolisme de la plante (Read et *al.*, 2021).

#### 3.1.4. Le cycle de l'azote

Le fer joue un rôle crucial dans le processus de fixation de N du cycle microbien de N. Il agit comme élément clé de la nitrogénase, l'enzyme responsable de la conversion de N atmosphérique en formes utilisables par les organismes (Trncik et *al.*, 2023). De manière inverse, une carence en N peut influencer la remobilisation du fer chez les plantes, en stimulant potentiellement la libération du fer des feuilles âgées pour soutenir la croissance des tissus plus jeunes (Parveen et *al.*, 2018).

#### 3.2. Absorption, transport et stockage du fer chez le riz

3.2.1. Absorption du fer : une approche hybride

Afin de s'adapter à la diversité des sols et des conditions environnementales, les plantes ont recours à deux stratégies distinctes pour l'absorption du fer : la stratégie I (stratégie de réduction) et la stratégie II (stratégie de chélation) (Kobayashi & Nishizawa, 2012 ; Römheld

& Marschner, 1986). La stratégie I, principalement utilisée par les plantes dicotylédones, implique la réduction catalytique du Fe<sup>3+</sup> en Fe<sup>2+</sup> par la ferric-chélate réductase (FRO) (Robinson et *al.*, 1999). Ensuite, le Fe<sup>2+</sup> est absorbé par les cellules racinaires via un transporteur régulé par le fer (IRT) à travers la membrane plasmique (Eide et *al.*, 1996). D'autres processus impliqués dans la stratégie I comprennent la libération de protons et de composés phénoliques par les racines dans la rhizosphère. Ces derniers servent respectivement à augmenter la solubilité du Fe<sup>3+</sup> en acidifiant la rhizosphère et à améliorer le pouvoir réducteur du Fe<sup>3+</sup> à la surface des racines.



Figure 1: Schéma combiné des stratégies I et II d'absorption du fer par les racines du riz

Contrairement à la stratégie I, la stratégie II est utilisée par les graminées. Cette stratégie implique la libération par les racines d'acide mugineique (MA) qui chélate le Fe<sup>3+</sup> présent dans le sol. Les MAs sont synthétisés à partir de la S-adénosyl-L-méthionine (SAM) grâce à l'action de trois synthases : la nicotianamine synthase (NAS), la nicotianamine aminotransférase (NAAT) et la désoxymugineic acid synthase (DMAS). Ce processus produit initialement de l'acide désoxymugineique (DMA) qui est ensuite hydroxylé en MA. Le MA est excrété dans la rhizosphère par le transporteur d'acide mugineique (OsTOM) (Nozoye et *al.*, 2011). Une fois dans le sol, le MA chélate le Fe<sup>3+</sup> pour former des complexes Fe<sup>3+</sup>-MA qui sont ensuite absorbés par les racines grâce à des transporteurs spécifiques de type yellow stripe-like (YSL), plus précisément OsYSL15 et OsYSL16 (Inoue et *al.*, 2009 ; Kakei et *al.*, 2012).

Bien que le riz soit classé comme plante de Stratégie II, il adopte une stratégie d'absorption du fer hybride, intégrant des aspects de la Stratégie I (Figure 1). Contrairement aux plantes de Stratégie I, l'activité de la FRO dans les racines du riz est très faible. Cela s'explique par l'exposition des racines à des conditions anaérobies et l'abondance de Fe<sup>2+</sup>, permettant une absorption directe sans activation de la FRO. L'absorption directe du Fe<sup>2+</sup> implique des transporteurs de fer OsIRT1 et OsIRT2, ainsi que des familles de protéines associées à la résistance naturelle des macrophages (NRAMP) telles que OsNRAMP1 et OsNRAMP5. De plus, tout comme les plantes de Stratégie I, en situation de faible disponibilité en fer, le riz libère des composés phénoliques comme l'acide protocatéchuïque (PCA) et l'acide caféique (CA) (Bashir et *al.*, 2011). Ces composés sont libérés dans la rhizosphère par le canal d'efflux des phénols zéro 2 (OsPEZ2) et présentent des propriétés chimiques capables de chélater et de réduire le Fe<sup>3+</sup> in vitro (Bashir et *al.*, 2011 ; Yoshino & Murakami, 1998).

#### 3.2.2. Le transport du fer : de la racine vers la biomasse aérienne

Le transport du fer à l'intérieur du plant de riz repose principalement sur la pression racinaire, la force d'aspiration due à la transpiration et les protéines transporteuses. En raison de la forte réactivité du fer, sa translocation dans la plante nécessite la participation de molécules chélatrices et une régulation stricte de ses états d'oxydoréduction. Des études physiologiques et moléculaires ont permis d'identifier des chélateurs clés au sein du système végétal, notamment le citrate, l'acide nicotinamique (NA) et les MAs

Le citrate joue un rôle dominant dans la chélation et le transport du fer dans le xylème du riz sous forme de complexes Fe<sup>3+</sup>-citrate. L'enzyme ferric reductase defective like 1 (OsFRDL1) facilite son efflux dans le xylème (Yokosho et al., 2009). Intéressant à noter, l'inactivation d'OsFRDL1 ne provoque que de légers troubles de l'homéostasie du fer, suggérant l'existence de chélateurs alternatifs pour le transport du fer dans le xylème (Inoue et al., 2004 ; Yokosho et al., 2009). En revanche, le NA et le MA facilitent le transport du fer dans le phloème du riz par chélation, formant des complexes Fe<sup>2+</sup>-NA et Fe<sup>3+</sup>-MA. Ce processus est médié par des transporteurs de type YSL assurant les échanges entre les tissus (Bashir et al., 2010; Schuler et al., 2012). Parmi les 18 YSL identifiés chez le riz, certains, dont OsYSL15/16, OsYSL18 et OsYSL9, sont spécifiquement responsables du transport du Fe<sup>3+</sup>-MA dans le phloème, les organes reproducteurs e2012 ; grains de riz (Aoyama et al., 2009 ; Inoue et al., 2009 ; Kakei et al., 2012 ; Senoura et al., 2017). À l'inverse, OsYSL2 et 9 sont responsables de tout le transport des complexes Fe<sup>2+</sup>-NA (Koike et *al.*, 2004). L'implication du transporteur IRT dans le transport du Fe<sup>2+</sup> reste controversée et nécessite des recherches supplémentaires. Bien que les progrès dans l'identification des transporteurs du fer chez le riz soient encourageants, des lacunes subsistent dans la compréhension des mécanismes de transport spécifiques, des types de chélateurs, de leurs contributions individuelles et de leurs rôles selon les tissus.

#### 3.2.3. Le stockage du fer dans le riz

La ferritine, une protéine clé en biologie végétale, joue un rôle crucial dans le stockage du fer au niveau cellulaire. À l'intérieur des cellules, le fer peut soit s'associer à des protéines, soit être stocké dans des compartiments tels que les vacuoles. Ces ferritines s'assemblent en 24 sous-unités, formant des cages sphériques capables d'encapsuler des milliers d'atomes de fer (jusqu'à environ 4500) constituant ainsi des complexes fer-protéines (Briat et al., 2010a ; Yang R. et al., 2015). Des recherches utilisant des analyses de similarité de séquence par rapport aux gènes de ferritine identifiés ont permis d'identifier deux types de ferritines chez le riz, OsFER1 et OsFER2 (Gross et al., 2003). Il est important de noter que la ferritine est largement distribuée dans divers organites, y compris les plastides (chloroplastes) des racines et de la biomasse aérienne, ainsi que dans les mitochondries, permettant un stockage efficace du fer dans toute la plante (Morrissey & Guerinot, 2009). Sur le plan fonctionnel, la ferritine joue deux rôles essentiels : stocker le fer pour empêcher son interaction avec des molécules réactives et faciliter la conversion de la forme réactive Fe<sup>2+</sup> en la forme non réactive Fe<sup>3+</sup>, protégeant ainsi l'intégrité cellulaire (Verbon et al., 2017). De plus, l'expression du gène de la ferritine chez les plantes est régulée de manière complexe par des facteurs métaboliques, notamment la réponse au stress oxydatif induit par le fer. L'induction de ce stress oxydatif conduit à une régulation positive de l'expression du gène de la ferritine (Stein et al., 2009), soulignant l'interaction dynamique entre la ferritine et l'homéostasie du fer dans les plants de riz.

En plus de la ferritine, les vacuoles jouent un rôle essentiel et dynamique dans le maintien de l'équilibre cellulaire, servant de principal lieu de stockage des métaux comme le fer. Le transport du fer vers la vacuole est facilité par la famille des transporteurs vacuolaires du fer (VIT), en particulier par OsVIT1 et OsVIT2 chez le riz (Zhang Y. et *al.*, 2012). L'inactivation de ces gènes perturbe la séquestration du fer dans les vacuoles, conduisant à une concentration plus élevée de fer dans les limbes foliaires et les grains, ce qui suggère leur rôle crucial dans le stockage vacuolaire du fer (Che et *al.*, 2021). De plus, en cas d'excès de fer, l'expression d'OsVIT1 est régulée à la hausse (Finatto et al., 2015). En revanche, les NRAMP permettent de libérer le fer stocké. Lorsque les plantes ont besoin d'accéder au fer stocké dans les vacuoles, elles abaissent le pH environnant, ce qui active les systèmes d'efflux qui le libèrent dans le cytosol.

#### 3.3. Effet de la toxicité ferreuse sur les plants de riz

Bien que les plants de riz possèdent des mécanismes de régulation sophistiqués pour l'absorption, le transport et le stockage du fer, comme décrit précédemment, une exposition à des niveaux élevés de Fe<sup>2+</sup> dans la solution du sol peut submerger ces mécanismes, conduisant à une accumulation excessive dans la partie aérienne. À des niveaux toxiques, le fer déclenche la surexpression de gènes associés à des voies métaboliques spécifiques, en particulier celles liées à la réponse au stress et à la défense antioxydante. Ce changement métabolique contribue à la génération accrue d'anion radical superoxyde ( $O_2^{-}$ ), une espèce réactive de l'oxygène (ROS) importante. L'O2<sup>--</sup> est le principal ROS d'origine cellulaire, initiant une cascade de réactions qui forment des ROS secondaires. Il est produit par la réduction d'un électron de l'oxygène moléculaire à l'intérieur de la cellule. Sa réaction la plus importante est la dismutation, qui se produit de manière non enzymatique ou par l'action de la superoxyde dismutase (SOD), la transformant en peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sert de réactif pour la réaction de Fenton avec Fe<sup>2+</sup> pour générer des radicaux hydroxyl (OH•), des ROS hautement réactifs ayant une forte affinité pour les biomolécules (Mittler, 2017). La réaction de Haber-Weiss amplifie encore la génération de OH• en régénérant Fe<sup>2+</sup>, le catalyseur de la réaction de Fenton (Figure 2) (Kehrer, 2000).

(A) Fenton reaction

$$Fe^{2+}$$
 +  $H_2O_2 \longrightarrow Fe^{3+}$  +  $OH^-$  +  $OH^-$ 

(B) Haber-Weiss reaction

 $O_2^{\bullet}$  +  $H_2O_2 \longrightarrow O_2$  +  $OH^-$  +  $OH^{\bullet}$ 

(C) Fe-catalyzed Haber-Weiss reactions



**Figure 2:** Formation de ROS par les réactions de Fenton et Haber-Weiss. (A) La réaction de Fenton (B) La réaction de Haber-Weiss (C) La réaction de Haber-Weiss catalysée par des ions Fe redox-actifs.

Concrètement, les ROS constituent une menace importante pour les plants de riz en provoquant des dommages oxydatifs à diverses biomolécules et en déclenchant des dysfonctionnements cellulaires. Ces dommages comprennent l'oxydation des biomolécules telles que les lipides et les protéines, l'oxydation individuelle des nucléotides de l'ADN et de l'ARN, l'inhibition enzymatique et l'activation de l'apoptose (Dumanović et *al.*, 2021 ; Mittler, 2017). De plus, le  $H_2O_2$  est reconnu depuis longtemps comme un puissant inhibiteur de la photosynthèse car, même à de faibles concentrations, il peut inhiber la fixation du CO<sub>2</sub> de 50 % en oxydant les enzymes du cycle de Calvin (Foyer & Shigeoka, 2011).

Les ROS, libérées par la toxicité ferreuse comme décrit précédemment, provoquent des ravages sur les biomolécules foliaires, entraînant des symptômes révélateurs du « brunissement foliaire », une indication claire et bien documentée de la toxicité ferreuse chez le riz (Howeler, 1973). Au départ, le brunissement apparaît généralement sous forme de petits points bruns sur les extrémités des feuilles les plus âgées, les premières à accumuler un excès de fer en raison de sa mobilité limitée dans la plante. À mesure que la toxicité ferreuse s'intensifie, ces points se rejoignent, couvrant une zone foliaire plus étendue et se propageant progressivement vers la base. Dans les cas graves, la décoloration peut même s'étendre aux feuilles plus jeunes, affectant finalement l'ensemble du couvert végétal. Le spectre de couleurs varie selon les variétés de riz, allant du brun, à l'orange, avec des reflets violets selon les génotypes (Peng X. X. & Yamauchi, 1993). Si l'accumulation de polyphénols oxydés peut contribuer à cette décoloration des feuilles, d'autres facteurs pourraient également être impliqués.

En plus des symptômes foliaires, d'autres symptômes peuvent apparaître chez les plants de riz intoxiqués au fer, notamment un mauvais développement racinaire (Zhang Y. et *al.*, 2011). Les racines deviennent alors courtes, épaisses et brun foncé, et peinent à assurer correctement leurs fonctions. Cet affaiblissement entrave la capacité de la plante à absorber et à utiliser les nutriments essentiels, conduisant à des carences nutritives. Des études indiquent que la toxicité ferreuse chez le riz peut stimuler la production d'éthylène, susceptible d'affecter la croissance via des interactions complexes avec l'absorption des nutriments et d'autres réponses au stress (Yamauchi M. & Peng, 1995). La disponibilité limitée des nutriments due à la toxicité ferreuse réduit considérablement la hauteur de la plante, sa biomasse et la production de matière sèche. Une surproduction d'éthylène peut également contribuer au retard de croissance, selon sa gravité et ses interactions avec d'autres facteurs de stress. Enfin, comme la plante priorise sa survie à sa reproduction face à ce stress, elle limite le nombre de talles, réduisant ainsi son rendement potentiel en grains.

En conclusion, la toxicité ferreuse menace considérablement les rendements du riz, avec des pertes potentielles allant de 12 % à 100 % (perte totale de récolte) (Sahrawat, 2004). Cette grande variabilité dépend de facteurs tels que la gravité de la toxicité, la variété de riz et les conditions environnementales. En Afrique de l'Ouest, on attribue une réduction moyenne du rendement de 45 % à la toxicité ferreuse. Même la simple réduction du tallage peut entraîner des pertes dévastatrices de 20 % à 50 %, ce qui souligne la nécessité de stratégies de gestion proactive pour protéger les cultures de riz (Becker & Asch, 2005).

#### 3.4. Adaptation du riz à la toxicité ferreuse

Dans les rizières inondées, le fer est réduit en Fe<sup>2+</sup>, facilement assimilable par les plantes, ce qui entraîne une toxicité ferreuse. Pour survivre, le riz a développé des mécanismes de tolérance à plusieurs niveaux pour contrer cette toxicité.

3.4.1.Mécanismes racinaires 3.4.1.1. Exclusion du fer

En première ligne du mécanisme de défense se trouve l'oxydation du Fe<sup>2+</sup> au niveau de la rhizosphère, ce qui diminue sa disponibilité pour l'absorption par la plante. Ce processus repose sur un système de transport d'oxygène descendant, acheminant l'oxygène depuis la tige vers les racines par des canaux remplis d'air (aérenchyme). Cet apport d'oxygène favorise l'oxydation du Fe<sup>2+</sup> en Fe<sup>3+</sup>, le rendant moins assimilable. Les conditions anaérobies induisent la production d'éthylène, stimulant ensuite la formation d'aérenchyme. On observe une forte corrélation entre le génotype du riz et son taux de production d'éthylène (Kawase, 1981). L'étendue de la formation d'aérenchyme varie selon les génotypes de riz et le stade de développement de la plante. Ces canaux d'aérenchyme occupent une part importante du volume racinaire total, pouvant aller de 20 à 50 % selon ces facteurs (Armstrong, 1980). Le pic de pouvoir oxydatif protecteur conféré par l'aérenchyme se situe pendant les premiers stades de croissance, s'étendant de 3 semaines après le repiquage jusqu'au tallage maximum. Cela correspond au fonctionnement optimal de l'aérenchyme induit par l'éthylène (Tadano, 1975). Cependant, une dégénérescence progressive de l'aérenchyme après cette période rend le riz de plus en plus vulnérable à la toxicité ferreuse pendant le stade reproductif, en raison de la diminution du pouvoir d'oxydation racinaire (Tinh, 1999).

En plus des larges aérenchymes, plusieurs facteurs contribuent à l'amélioration du pouvoir oxydatif des racines. Un diamètre plus important de la cavité médullaire facilite une meilleure diffusion de l'oxygène par transport descendant, améliorant ainsi l'apport d'oxygène aux racines et augmentant leur pouvoir d'oxydation. Le renforcement des bandes de Caspary dans l'épiderme racinaire, agissant comme une barrière cireuse, contribue également à une diffusion efficace contre le Fe<sup>2+</sup> (Becker et al., 2020 ; Hinrichs et al., 2017). De plus, un nombre accru de racines latérales se traduit potentiellement par une oxydation racinaire globale plus élevée, améliorant ainsi la tolérance à la toxicité ferreuse (Wu L. B. et al., 2014). L'oxydation du fer déclenchée par l'aérenchyme, associée aux facteurs mentionnés ci-dessus, entraîne la formation de dépôts insolubles de Fe(OH)<sub>3</sub> à la surface des racines, appelés « plaque de fer ». Cette plaque agit comme une barrière contre l'absorption excessive de Fe<sup>2+</sup> dans les tissus radiculaires (Liu et al., 2011; Peng C. et al., 2018; Pereira et al., 2014). Les génotypes de riz ayant une meilleure exclusion du fer, présentent une formation plus importante de plaque de fer sur leurs racines, suggérant une tolérance accrue à la toxicité ferreuse. À titre de référence, un cultivar de zone humide, « Brazos », accumule une plaque de fer importante, représentant 10 % du poids sec des racines, ce qui indique son efficacité d'exclusion du fer (Chen C. C. et al., 1980). Au-delà des barrières physiques, le riz prend des mesures supplémentaires au niveau génétique. En réponse à l'excès de fer, le riz régule à la baisse l'expression des gènes responsables de l'absorption et du transport du fer (OsIRT1, OsIRT2 et OsYSL2) (Aung et al., 2018 ; Finatto et al., 2015 ; Quinet et al., 2012). De plus, les gènes associés à la biosynthèse des MAs sont également régulés à la baisse, limitant potentiellement la sécrétion de MA dans la rhizosphère, un composé qui facilite l'absorption du fer (Aung et al., 2018).

#### 3.4.1.2. Rétention du fer

Les mécanismes d'oxydation du fer au niveau des racines transforment le Fe<sup>2+</sup> en Fe<sup>3+</sup>. Cependant, les limitations de ces mécanismes font qu'une partie importante du Fe<sup>2+</sup> reste facilement absorbable par les tissus radiculaires. Heureusement, le riz dispose d'un mécanisme de tolérance interne aux racines qui permet de retenir le fer dans la racine et de réduire son transport vers les parties aériennes (Becker & Asch, 2005 ; Silveira et *al.*, 2007 ; Tadano, 1975). Les génotypes tolérants peuvent stocker 70 % de fer en plus dans leurs racines, peuvent également en précipiter environ 94 % sous forme non toxique en conditions de toxicité ferreuse, contrairement aux génotypes sensibles (Stein et *al.*, 2014). Pour séquestrer l'excès de fer dans les racines, le riz utilise divers compartiments ou tissus. Il peut l'accumuler dans la ferritine, l'éliminer dans une vacuole après l'avoir converti sous une forme non toxique, ou encore l'exclure du symplasme pour le relarguer dans l'apoplasme. En réponse à l'excès de fer, le riz régule à la hausse l'expression des gènes de la ferritine (OsFER1 et OsFER2) et des transporteurs vacuolaires de fer (OsVIT2) dans les racines, renforçant ainsi leur rôle dans la séquestration du fer (Aung et *al.*, 2018 ; Briat et *al.*, 2010b ; Finatto et *al.*, 2015 ; Quinet et *al.*, 2012 ; Stein et *al.*, 2009).

De plus, les graminées, comme le riz, utilisent des « sites de déversement » tels que le centre de discrimination (DC) situé à la base de la partie aérienne pour gérer l'homéostasie du fer (Mori, 1998). Ces sites stockent et régulent la distribution du fer, empêchant ainsi son accumulation néfaste dans les feuilles les plus jeunes et les plus sensibles du riz. Le DC achemine stratégiquement le fer vers les feuilles plus âgées, un processus crucial pour la survie de la plante (Aung et *al.*, 2018). La suppression de l'expression des gènes associés au transport du fer (OsIRT1, OsYSL2, OsTOM1, OsNRAMP1, OsYSL15) dans le DC renforce son rôle de limitation de la distribution du fer (Aung & Masuda, 2020).

#### 3.4.2. Mécanismes caulinaires et foliaires *3.4.2.1. Compartimentation du fer*

Aung et *al.* (2018) ont observé une multiplication par neuf de la concentration en fer des racines du riz suite à un traitement à base de fer multiplié par vingt, confirmant ainsi l'accumulation de fer dans les racines. Cependant, cette accumulation plafonne à des niveaux plus élevés, indiquant une capacité d'accumulation limitée des racines. À ces concentrations, les mécanismes de rétention du fer dans les racines sont submergés par la toxicité ferreuse, ce qui oblige le riz à transférer l'excès de fer vers les parties aériennes.

Le riz, bien qu'il transfère du Fe<sup>2+</sup> vers ses parties aériennes, a vu certains génotypes évoluer et s'appuyer sur des mécanismes de tolérance basés sur les tiges et les feuilles pour garantir une croissance et un rendement sains. Des études le confirment : les génotypes tolérants accumulent significativement plus de fer dans leurs gaines foliaires et leurs tiges que les génotypes sensibles, ce qui protège les nouvelles limbes foliaires (Audebert & Sahrawat, 2000 ; Engel et *al.*, 2012). Cependant, cette stratégie n'est pas infaillible. Lors du transport acropète (de la base vers le sommet), le Fe<sup>2+</sup> est immobilisé et stocké dans ces tissus, souvent par la formation de ferritine dans le xylème (Seckback, 1982 ; Smith, 1984). Toutefois, l'efficacité de ce processus dépend toutefois du taux de transport acropète du Fe<sup>2+</sup>. En cas de forte transpiration, comme pendant la phase de croissance exponentielle du riz ou la saison sèche, le système peut être débordé, laissant le fer atteindre le limbe foliaire (Asch et *al.*, 2000, 2003).

De plus, la capacité de stockage de la tige se sature avec le temps, surtout vers la fin du cycle de croissance du riz, limitant encore son efficacité.

Un autre mécanisme clé implique la translocation sélective du fer des racines vers les parties aériennes via le DC, ciblant principalement les feuilles les plus âgées (cf. 3.4.1.2.) pour protéger les plus jeunes. Fait intéressant, avec des niveaux plus élevés d'excès de fer, une plus grande quantité de fer est transportée préférentiellement vers les vieilles feuilles, qui présentent un brunissement plus précoce que les jeunes feuilles (Nugraha et *al.*, 2016). Certains génotypes tolérants accumulent plus de fer dans leurs parties aériennes, tout en parvenant à maintenir une croissance saine, contrairement à leurs homologues sensibles. Paradoxalement, ces génotypes présentent une concentration élevée en fer dans les parties aériennes, mais ont des symptômes foliaires réduits et un rendement en grains plus élevé. Comme pour la rétention du fer dans les racines, le fer est séquestré dans les feuilles, soit dans la ferritine, soit dans une vacuole.

De plus, le pH apoplasmique des feuilles peut influencer la mobilité du fer à l'intérieur de celles-ci. Un pH apoplasmique bas favorise la mobilité du Fe<sup>2+</sup>, tandis qu'un pH plus élevé la réduit, oxydant potentiellement le fer en Fe<sup>3+</sup> et minimisant son mouvement dans la feuille (Mengel & Kosegarten, 2000 ; Nikolic & Römheld, 2001). Ce processus implique la formation de polymères non diffusibles qui se lient au Fe<sup>3+</sup>, diminuant l'activité de la FRO et limitant ainsi l'utilisation du Fe<sup>3+</sup>. Des polysaccharides spécifiques de la paroi cellulaire jouent également un rôle dans ce phénomène (Lucena, 2000 ; W. Schmidt, 1999 ; Yamauchi M. & Peng, 1995). Chez les plantes dépourvues de régulation du pH apoplasmique ou présentant une activité FRO réduite, une accumulation incontrôlée de Fe<sup>2+</sup> ou un afflux excessif dans les cellules foliaires peuvent se produire (Welch et *al.*, 1993).

#### 3.4.2.2. Tolérance tissulaire : détoxification des ROS

La production de ROS par les réactions de Fenton et Haber-Weiss, particulièrement néfaste pour les biomolécules, est une conséquence majeure de la toxicité ferreuse chez le riz (cf. 3.3). Heureusement, les plants de riz peuvent résister dans une certaine mesure aux dommages oxydatifs cellulaires grâce à une détoxification enzymatique et non enzymatique. L'ascorbate et le glutathion cytosoliques sont des antioxydants non enzymatiques bien connus et importants qui piègent les ROS chez les plantes et autres organismes. Bien qu'ils ne soient pas exclusifs, les caroténoïdes, les tocophérols, les composés phénoliques et les flavonoïdes contribuent de manière essentielle au système de défense antioxydant non enzymatique (Dumanović et *al.*, 2021). De plus, des enzymes comme la SOD jouent un rôle important dans le piégeage des ROS. La SOD dismute principalement l'O<sub>2</sub><sup>--</sup> en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ; cependant, bien qu'étant moins réactif que l'O<sub>2</sub><sup>--</sup>, le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> réduit l'activité de la SOD. Par conséquent, une prévention efficace des dommages oxydatifs nécessite une détoxification supplémentaire du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par la CAT et/ou la POD. L'activité combinée des enzymes SOD et POD s'est avérée être la principale responsable de la prévention du stress oxydatif induit par le Fe<sup>2+</sup> dans les feuilles de riz (Cakmak, 1988 ; Sen Gupta, 1993).

En outre, l'étude de Li B. et *al.*, (2019) a révélé que la S-nitrosoglutathion reductase (GSNOR), une enzyme liée à la voie de l'oxyde nitrique, protège les racines des plantes contre la cytotoxicité oxydative induite par la toxicité ferreuse. Cette étude a utilisé une mutation d'Arabidopsis, qui a montré un retard de croissance racinaire sous une forte concentration en

fer, confirmant ainsi le rôle crucial de la GSNOR. Si cette étude sur Arabidopsis démontre le rôle de la GSNOR dans la protection des racines contre la toxicité ferreuse, ses implications plus larges chez des plantes comme le riz et son mécanisme sous-jacent nécessitent des investigations plus approfondies.

#### 4. Stratégie de gestion agronomique pour contrôler la toxicité ferreuse 4.1. Gestion de l'eau

La toxicité ferreuse est aggravée par la submersion continue, qui favorise la réduction du Fe<sup>3+</sup> en Fe<sup>2+</sup>, plus mobile et donc plus facilement absorbable par la plante. Malgré ses inconvénients, et bien qu'elle ne soit pas indispensable à la production rizicole, la submersion continue reste le système d'irrigation le plus courant et le plus répandu pour le riz irrigué. De plus, la submersion continue contribue de manière significative aux émissions de gaz à effet de serre, en particulier de méthane (Peyron et *al.*, 2016).

Face à ce constat, il est devenu nécessaire de développer des techniques de gestion de l'eau qui allient la lutte contre la toxicité du fer à la durabilité de la culture du riz irrigué. Au fil des années, différentes techniques de gestion de l'eau ont été proposées pour faire face à la toxicité ferreuse, notamment la mise en eau différée (Schmidt F. et *al.*, 2013), l'irrigation intermittente (Prasetyo et *al.*, 2019), le cycle mouillage-séchage (Suriyagoda et *al.*, 2020) et le drainage en milieu de saison (Dossou-Yovo et *al.*, 2023). En résumé, chacune de ces techniques consiste à manipuler le niveau d'eau afin de rompre les conditions anaérobies continues, favorisant ainsi la lixiviation et la réoxydation du Fe<sup>2+</sup>, et réduisant les effets néfastes de la toxicité ferreuse sur le riz. Par conséquent, ces techniques permettent de diminuer la concentration de fer dans la solution du sol, les racines et les feuilles, tout en atténuant les symptômes foliaires et en améliorant la croissance du riz et le rendement en grains. De plus, ces techniques de gestion de l'eau se révèlent plus économes en eau et respectueuses de l'environnement par rapport à la submersion continue, car elles réduisent à la fois la consommation d'eau et les émissions de gaz à effet de serre (Peyron et *al.*, 2016).

#### 4.2. Gestion du sol

L'impact direct du pH du sol sur la solubilité du fer (cf. 2.3) et son influence indirecte sur d'autres processus pertinents en font un facteur particulièrement important parmi ceux qui influencent la toxicité ferreuse. Par conséquent, prioriser la régulation du pH dans les rizières, comme l'une des pratiques de gestion du sol les plus importantes, peut contribuer à réduire la prévalence de la toxicité ferreuse.

Le chaulage, une stratégie courante pour traiter les sols acides, fonctionne principalement en neutralisant l'acidité du sol et en augmentant son pH. Bien qu'il permette de lutter efficacement contre l'acidité, le chaulage peut également diminuer la disponibilité du Fe<sup>2+</sup>, ainsi que d'autres micronutriments comme le manganèse (Mn), le cuivre (Cu) et le Zn (Bhindhu et *al.*, 2018). Cette diminution s'explique par deux mécanismes principaux. Premièrement, à des niveaux de pH plus élevés, le fer tend à précipiter sous des formes moins solubles, réduisant son accessibilité pour l'absorption par les plantes et appauvrissant le réservoir de fer facilement disponible dans le sol. Deuxièmement, l'ajout de calcium (Ca) et de magnésium (Mg) par le chaulage contribue également à la diminution de la disponibilité des micronutriments, bien que dans une moindre mesure par rapport à la précipitation due au pH. Ces cations entrent en compétition avec le fer pour les sites de fixation sur les particules du sol, pouvant

potentiellement déplacer le fer du réservoir facilement accessible et limiter davantage son accessibilité aux racines des plantes.

En plus de corriger l'acidité du sol, l'application de chaux, notamment de chaux calcique et dolomitique, apporte directement au sol des nutriments essentiels pour les plantes, le Ca et le Mg. Elle peut également améliorer la disponibilité de certains nutriments, notamment le P et le potassium (K), qui entrent en compétition avec le Fe<sup>2+</sup> pour les sites d'absorption sur les membranes des racines du riz (Han et *al.*, 2019 ; Mkhonza et *al.*, 2020). Cette compétition peut potentiellement réduire l'absorption de fer par les racines du riz, atténuant ainsi la toxicité ferreuse. Cependant, il est crucial de se rappeler que l'impact du chaulage sur la toxicité ferreuse dépend fortement du contexte. Des facteurs tels que le pH initial du sol, la minéralogie de l'argile et la quantité de chaux appliquée influencent de manière significative l'efficacité de ces effets. De plus, tout en visant à corriger la toxicité ferreuse, un chaulage excessif peut entraîner une carence en d'autres micronutriments en raison de leur très faible solubilité à des niveaux de pH exceptionnellement élevés. Par conséquent, une prise en compte attentive des différents facteurs et des conséquences potentielles est essentielle avant de mettre en œuvre des pratiques de chaulage afin de garantir une approche équilibrée de la gestion de la fertilité du sol.

En plus du chaulage, la gestion de la matière organique du sol offre une stratégie viable pour atténuer la toxicité ferreuse. La matière organique peut réguler la solubilité du fer dans le processus d'oxydo-réduction, en favorisant des conditions de sol réductrices (ce qui stimule la conversion du Fe<sup>3+</sup> en Fe<sup>2+</sup>) ou en piégeant potentiellement les éléments toxiques (formation de complexes avec le Fe<sup>2+</sup>) dans les sols acides. Les apports de matière organique, comme le compost avec un rapport C/N inférieur à 20, peuvent diminuer la concentration de Fe<sup>2+</sup> car le processus de chélation est plus important que le processus de réduction (Annisa & Nursyamsi, 2017). À l'inverse, la matière organique avec un rapport C/N supérieur à 20 tend à augmenter la concentration de Fe<sup>2+</sup> en favorisant la réduction du Fe<sup>3+</sup>.

#### 5. Rôle d'autres éléments nutritifs sur la toxicité ferreuse 5.1. Phosphore

Une carence en P est fréquente dans les sols fortement altérés des vallées, généralement pauvres en P. Elle interagit avec la toxicité ferreuse, souvent en exacerbant ses effets directs (Sahrawat, 2004). Lorsque le riz souffre d'une carence en P, il présente des réponses contradictoires à la toxicité ferreuse. La carence en P stimule la croissance des racines, conduisant à un système racinaire plus important avec une surface plus étendue. Cela expose la plante à plus de Fe<sup>2+</sup> dans le sol. D'autre part, elle améliore également la libération d'oxygène par les racines, convertissant potentiellement le Fe<sup>2+</sup> nocif en une forme moins toxique et offrant une certaine protection contre la toxicité ferreuse (Fu et *al.*, 2014 ; Kirk & Du, 1997).

Cependant, la carence en P fragilise également l'intégrité des membranes des cellules racinaires, provoquant une fuite de substances organiques dans le sol environnant. Ces matières organiques peuvent involontairement alimenter la reconversion du Fe(OH)<sub>3</sub> oxydé non toxique en la forme nocive de Fe<sup>2+</sup>, ce qui pourrait aggraver la toxicité ferreuse. Par conséquent, l'impact global de la carence en P sur la toxicité ferreuse chez le riz est complexe et dépend du contexte (Kirk & Du, 1997 ; Rose et *al.*, 2013).

#### 5.2. Potassium

Le K est le cation monovalent le plus abondant dans les cellules végétales. Il joue un rôle crucial dans de nombreux processus physiologiques essentiels, tels que la photosynthèse, le transport des produits d'assimilation et la tolérance aux stress biotiques et abiotiques (Wang & Wu, 2013). Plusieurs études ont démontré une interaction complexe entre l'état du K et l'absorption du fer chez le riz en situation d'excès de fer. Cependant, les mécanismes physiologiques sous-jacents et le rôle de l'homéostasie interne du K dans la tolérance à la toxicité ferreuse restent à élucider.

Des études ont démontré que le K peut améliorer l'oxydation racinaire, favoriser la formation de racines latérales et atténuer la suppression de la croissance des racines primaires causée par la toxicité ferreuse (Li G. et *al.*, 2016). De plus, l'apport de K augmente significativement l'activité d'enzymes antioxydantes comme la POD, la SOD et la CAT, conduisant à une diminution de la teneur en malondialdéhyde (MDA) dans des conditions de toxicité ferreuse (Gao et *al.*, 2014).

Des éléments supplémentaires viennent étayer le rôle du K dans la tolérance a la toxicité ferreuse. Une étude d'association pangénomique (GWAS) a identifié le gène OsAKT1, codant pour un canal potassique, comme étant lié à la régulation de la concentration en fer dans les parties aériennes du riz (Matthus et *al.*, 2015). Des recherches ultérieures utilisant des mutants d'OsAKT1 avec perte de fonction ont confirmé que l'absorption réduite de K et l'accumulation accrue de fer dans les parties aériennes se produisent chez les plantes carencées en K et exposées à la toxicité ferreuse, tandis que les niveaux de fer racinaire restent inchangés (Wu et *al.*, 2019). Ces résultats soutiennent fortement l'idée qu'OsAKT1 joue un rôle essentiel dans la tolérance du riz à la toxicité ferreuse, car le maintien de l'homéostasie du K influence directement le transport du fer de la racine vers les parties aériennes.

Cependant, l'apport de K ne permet pas d'éliminer complètement la toxicité ferreuse chez le riz, son efficacité étant limitée comme le soulignent les études de Montás Ramírez et *al.* (2002). Ces dernières mettent en évidence les limites du K dans la suppression totale de la toxicité ferreuse. De plus, un taux élevé de K dans le sol peut avoir un impact négatif sur la disponibilité d'autres éléments nutritifs.

#### 5.3. Calcium et magnesium

Malgré des réponses similaires face aux modifications du sol induites par les racines en situation de toxicité ferreuse (Kirk et *al.*, 2022), les réponses du Ca et du Mg sur la physiologie de la plante pourraient diverger.

La carence en Mg, associée à la toxicité ferreuse, est plus fréquente et s'est avérée induire une toxicité ferreuse excessif, conduisant à un stress oxydatif et à une inhibition ultérieure de la photosynthèse (Kobayashi et *al.*, 2018). On suppose que la carence en Mg perturbe le mécanisme de stockage des ions ferreux toxiques dans les vacuoles des jeunes cellules foliaires en expansion. De plus, avec un apport suffisant en Mg, la concentration en ROS a diminué de 31% par rapport aux plantes carencées en Mg, conduisant à une réduction des activités de la plupart des enzymes et métabolites antioxydants (Hauer-Jákli & Tränkner, 2019).

En revanche, une étude de Sarma & Bharali, (2015) a révélé que l'apport supplémentaire en Ca aide le riz à se remettre de la toxicité ferreuse. Cet effet est probablement dû à la capacité du Ca d'atténuer les effets néfastes du fer sur les chloroplastes, potentiellement en augmentant la teneur en chlorophylle et en réduisant la dégradation des protéines (Poovaiah & Leopold, 1973). Cela suggère que la supplémentation en Ca pourrait améliorer les rendements des cultures de riz dans les sols riches en fer.

#### 5.4. Silicium (Si)

Le Si, en soi, n'est pas considéré comme un élément essentiel pour les plantes supérieures. Cependant, il est abondamment présent chez certaines espèces, notamment celles de la famille des Poacées, dont le riz, qui peut en accumuler jusqu'à 10 % du poids sec de ses parties aériennes (Ma & Takahashi, 2002).

Des études ont montré que l'application de Si sur le riz augmente sa tolérance aux stress biotiques et abiotiques, y compris la toxicité ferreuse (Coskun et *al.*, 2019 ; Debona et *al.*, 2017). Bien que son rôle spécifique dans le métabolisme des plantes reste flou, il a été démontré que le Si stimule la formation de bandes de Casparian dans l'exoderme, ce qui entrave le flux de fer vers l'apoplasme et réduit l'absorption du fer par les plants de riz (Becker et *al.*, 2020). Cette diminution de l'absorption du fer chez les plantes traitées au Si se traduit par une concentration plus faible de fer dans les tissus foliaires et racinaires, atténuant visuellement les symptômes de toxicité ferreuse (Dufey et *al.*, 2014). De plus, l'application de Si renforce l'activité d'enzymes antioxydantes telles que la CAT, la péroxidase ascorbate et la péroxidase soluble en cas de toxicité modérée au fer, ce qui conduit à une détoxification accrue du peroxyde d'hydrogène et à une peroxydation lipidique réduite. La nutrition en Si pourrait donc atténuer la toxicité ferreuse en diminuant la concentration en fer de la plante et en stimulant l'activité des enzymes antioxydantes.

#### 6. Lacunes de connaissances, objectifs et plan de thèse

Malgré les recherches existantes sur les mécanismes de tolérance du riz, un manque crucial de connaissances subsiste quant à la transposition des résultats obtenus en milieux contrôlés aux conditions réelles au champ. Cet écart découle de deux limitations principales :

(i) négligence de l'exposition chronique à la toxicité ferreuse : l'étude du riz en milieux contrôlés sur de courtes périodes ne permet pas de saisir la nature chronique de la toxicité ferreuse observée dans les champs. Cela pourrait conduire à négliger des mécanismes cruciaux d'adaptation et d'acclimatation à long terme qui permettent la tolérance tout au long du cycle de croissance.

(ii) omission de facteurs complexes propres aux conditions réelles au champ : la recherche néglige souvent l'interaction complexe des facteurs environnementaux présents dans les champs, tels que les conditions du sol, les conditions météorologiques et les interactions avec d'autres éléments nutritifs. Cela peut conduire à des résultats trompeurs, où des génotypes jugés tolérants en conditions contrôlées succombent à la toxicité ferreuse lorsqu'ils sont cultivés en conditions réelles.

De plus, une compréhension complète de la façon dont divers éléments nutritifs interagissent et influencent la toxicité ferreuse, y compris leur impact sur l'équilibre nutritionnel interne de différents génotypes de riz, reste floue. Bien que la recherche ait exploré les effets individuels de certains nutriments comme le K et le Si, une vision d'ensemble manque. Ce manque de connaissances entrave le développement de stratégies de gestion holistiques pour relever efficacement les défis de la toxicité ferreuse dans la culture du riz. De plus, comprendre comment différents génotypes de riz maintiennent ou adaptent leur équilibre nutritionnel interne sous stress ferreuse est crucial pour identifier les mécanismes de tolérance et développer des variétés de riz résistantes.

Ce domaine spécifique, relevant du vaste manque de connaissances, requiert une investigation plus approfondie. Ces lacunes justifient la présente thèse, qui a pour objectifs généraux de faire progresser la compréhension et l'identification des mécanismes de tolérance du riz contre la toxicité ferreuse en conditions réelles au champ. Pour atteindre ces objectifs généraux, les principaux objectifs de recherche étaient les suivants :

1. Caractériser les différences génotypiques dans les mécanismes de tolérance en conditions réelles au champ, afin de développer des méthodes de criblage adaptées aux mécanismes individuels et à leurs interactions.

2. Caractériser les effets de l'apport de Mg et de K sur les réponses à la toxicité ferreuse de divers génotypes de riz dans un champ fortement toxique.

3. Analyser l'état nutritionnel des génotypes de riz présentant différents mécanismes de tolérance contre la toxicité ferreuse.

Afin d'atteindre les objectifs fixés dans ce mémoire, une série d'expérimentations a été menée à différentes échelles. Pour aborder le premier objectif, une expérience en champ a été réalisée en utilisant différents génotypes initialement sélectionnés pour leur tolérance diverse à la toxicité ferreuse (Chapitre 2). Cette étude approfondie s'est étendue sur deux saisons de riziculture. Ensuite, le deuxième objectif, tel que décrit au chapitre 3, a été atteint grâce à une autre expérience en champ portant sur sept génotypes distincts présentant des mécanismes de tolérance variés. Un dispositif comprenant huit traitements fertilisants a été utilisé pour évaluer leurs impacts sur les réponses à la toxicité ferreuse. Enfin, le chapitre 4 se penche sur les niveaux d'état nutritionnel pour répondre au troisième objectif. Une analyse de l'état nutritionnel des génotypes utilisés dans l'expérience initiale (Chapitre 2) a été réalisée afin de discerner des corrélations potentielles entre la composition nutritionnelle et les mécanismes de tolérance à la toxicité ferreuse.

# Mechanisms of genotypic differences in tolerance of iron toxicity in field-grown rice<sup>\*</sup>

#### \* This chapter is adapted from:

Rajonandraina Toavintsoa, Tovohery Rakotoson, Matthias Wissuwa, Yoshiaki Ueda, Tantely Razafimbelo, Andry Andriamananjara, and Guy JD Kirk. "Mechanisms of genotypic differences in tolerance of iron toxicity in field-grown rice." *Field Crops Research* 298 (2023): 108953.

#### Résumé étendu

**Contexte** : La toxicité ferreuse est un obstacle majeur à la production rizicole mondiale, en particulier dans les rizières submergées. Cela s'explique par la plus grande solubilité du fer ferreux (Fe<sup>2+</sup>) par rapport au fer ferrique (Fe<sup>3+</sup>) en milieu anaérobie, favorisant une absorption excessive par les plants de riz. Cette étude se concentre sur la toxicité ferreuse dans le contexte de la riziculture en Afrique subsaharienne, où des sols fortement altérés exacerbent le problème. Si la gestion de l'eau et des nutriments peut offrir une certaine atténuation, la sélection de génotypes tolérants s'avère être une solution à long terme plus pratique. Le riz présente une variation génotypique pour la tolérance à la toxicité ferreuse, mais les progrès en matière de sélection variétale restent lents. Cela est dû à deux facteurs principaux : l'identification d'allèles de tolérance à faible effet et la complexité des mécanismes physiologiques sous-jacents. Les recherches antérieures menées sur la toxicité ferreuse, axées sur des criblages au stade de plantule en solution nutritive, n'ont pas pris en compte ces complexités inhérentes à l'ensemble du cycle de vie du riz et aux conditions de plein champ.

**Objectif :** Cette recherche étudie les différences génotypiques de ces mécanismes dans des conditions de plein champ sur un sol à forte toxicité ferreuse des Hautes Terres centrales de Madagascar. Dans l'optique de développer des méthodes de criblage adaptées aux mécanismes individuels de tolérance au fer et à leurs interactions.

**Méthodes :** Une expérience de plein champ sur deux ans a évalué six et sept génotypes, respectivement lors de la première et la deuxième année. Tous les génotypes ont été classés comme tolérants ou sensibles sur la base d'un criblage préalable. L'expérimentation a utilisé un dispositif expérimental entièrement randomisé avec quatre répétitions par génotype. Les plantes ont été cultivées sur un gley à forte toxicité en fer et suivies tout au long de la saison de croissance. Les tissus suivants ont été prélevés à différents stades de développement du riz pour l'analyse des concentrations en fer, P et K : jeunes feuilles, feuilles intermédiaires, Feuilles âgées, et tige/gaine foliaire. De plus, des feuilles paniculaires ont été prélevées à la floraison et des panicules à maturité. Le score des symptômes foliaires (brunissement des feuilles) a été évalué visuellement pour quantifier la toxicité ferreuse. Le rendement en grains, la teneur en éléments nutritifs des tissus et l'absorption d'éléments nutritifs par les parties aériennes ont été mesurés. Des analyses statistiques ont été réalisées pour explorer les différences génotypiques et les relations entre ces paramètres et le score des symptômes foliaires.
**Résultats**: Plusieurs mécanismes de tolérance à la toxicité ferreuse étaient impliqués, et l'importance de ces derniers variait selon les stades de croissance. Les rendements en grains plus élevés des génotypes tolérants par rapport aux génotypes sensibles étaient principalement dus au maintien de la santé des plantes pendant les stades végétatifs. Cela a été réalisé soit en réduisant l'absorption du fer (exclusion), soit en minimisant l'effet d'un excès d'absorption du fer dans la partie aérienne de la plante en compartimentant le fer dans les feuilles âgées et les tiges, et par une tolérance tissulaire plus élevée. Les mécanismes d'exclusion se sont relâchés pendant le stade reproductif, entraînant une accumulation accrue du fer dans les parties aériennes, même chez les génotypes à mécanisme d'exclusion. Cependant, les génotypes tolérants ont tout de même pu se développer correctement, ce que nous attribuons à une combinaison de compartimentation du fer et de tolérance tissulaire, permettant au remplissage des grains de se dérouler sans entrave significative par des concentrations en fer tissulaire de plus en plus élevées. Les concentrations en P et en K des tissus étaient proches de ou inférieures aux limites de carence tout au long de la croissance. L'exclusion par oxydation du fer ferreux dans la rhizosphère entrave probablement l'accès des ions phosphate et K aux racines, mais les différences de concentration dans les tissus étaient bien inférieures aux différences de taux de croissance, ce qui suggère que ces derniers étaient principalement dictés par la toxicité ferreuse et que les symptômes visuels n'étaient pas toujours un indicateur fiable du potentiel de rendement. La sélection de la tolérance à la toxicité ferreuse basée uniquement sur les symptômes visuels, en particulier au stade de plantule, est donc trop simpliste et ne permet d'identifier que les génotypes très sensibles, et non pas la sélection de la plupart des génotypes les plus tolérants. La présence ou l'absence de symptômes visuels dans différents tissus peut néanmoins présenter un intérêt pour l'étude détaillée de mécanismes de tolérance spécifiques impliquant la compartimentation ou la tolérance tissulaire véritable. Pour identifier des donneurs et des marqueurs utiles à la sélection variétale, il est important de développer des protocoles de criblage qui capturent les mécanismes individuels de tolérance à différents stades de croissance. Il faut garder à l'esprit que les stades de croissance des plantes semblent avoir un effet important sur leur importance relative, leur expression et leur interaction possible. Il est donc important de tenir compte des changements entre les stades de croissance, ainsi que des interactions avec la nutrition minérale qui peuvent évoluer au fil du temps. L'intensité et la dynamique de la toxicité ferreuse sont très spécifiques à chaque site et varient fortement d'une année à l'autre en fonction du début et de l'intensité des pluies. Les variétés qui combinent plusieurs mécanismes de tolérance au stress seront probablement plus résilientes que celles qui n'en possèdent qu'un seul.

**Conclusion :** Cette étude met en lumière la complexité de la tolérance à la toxicité ferreuse chez le riz. La compréhension de l'interaction entre divers mécanismes à différents stades de croissance est cruciale pour que les sélectionneurs puissent développer des méthodes de criblage plus efficaces. Cela permettra à son tour de créer des variétés de riz dotées d'une tolérance robuste à la toxicité ferreuse, ce qui améliorera finalement la sécurité alimentaire dans les zones touchées. Nous avons identifié des génotypes donneurs prometteurs : KA-28 pour une compartimentation et une tolérance tissulaire efficaces du fer, L-43 pour l'exclusion du fer et Tsipala pour la tolérance malgré une sensibilité visuelle. Ces génotypes, porteurs de mécanismes de tolérance spécifiques, représentent de précieuses ressources génétiques pour la poursuite des recherches. L'étude des facteurs physiologiques et génétiques sousjacents de ces lignées devrait être une priorité, dans le but d'identifier des marqueurs et des gènes à pyramider dans des génotypes largement tolérants.

# 1. Introduction

Iron (Fe) toxicity is a major constraint to rice production globally, causing severe yield losses (Becker & Asch, 2005; Dobermann & Fairhurst, 2000). It occurs in submerged paddy soils because the biogeochemical changes following submergence cause large increases in the concentration of ferrous iron in the soil solution, potentially leading to excessive Fe uptake into rice plants (Becker & Asch, 2005). It is a problem in rice soils across the globe, but particularly in the highly weathered, nutrient-depleted soils of inland valleys in Sub-Saharan Africa where much of the African rice production takes place (Rodenburg et *al.*, 2014; van Oort, 2018). It is less of a problem in the young alluvial soils of the Asian rice lowlands, which have very different properties. Since that is where most rice research has been done, Fe toxicity has received less attention than other soil constraints to production. However, it is an increasingly important topic as attention is turned to increasing African rice production (Wopereis et *al.*, 2013).

Water and nutrient management can mitigate Fe toxicity where resources permit (Becker & Asch, 2005; Rakotoson et *al.*, 2019), but use of tolerant genotypes is more practicable. There is well-established variation in tolerance in both Oryza sativa and Oryza glaberrima gene pools for identifying donors and markers, yet progress in breeding has been slow (Kirk et *al.*, 2022). To date, genome-wide association studies have revealed only small-effect alleles for tolerance (Diop et *al.*, 2020; Melandri et *al.*, 2021; Meng et *al.*, 2017). This reflects multiple tolerance mechanisms, and difficulties in germplasm screening under field conditions due to large genotype-by-environment effects, and weak correlation between visible symptoms and beneficial stress response strategies.

Visible symptoms include leaf bronzing due to formation of reactive oxygen species (ROS), causing chlorophyll oxidation and impairment of photosynthesis (Pereira et *al.*, 2013). Leaf bronzing score (LBS) and loss of grain yield are often used for germplasm screening, but the relationship between these two is often weak (Rakotoson et *al.*, 2019; Sikirou et *al.*, 2015), though there are exceptions to this (Audebert & Fofana, 2009). Much of the work on tolerance mechanisms has been done in culture solutions or pots, but these poorly represent field conditions and the complex interactions between Fe toxicity and soil physiochemical conditions.

Four types of tolerance mechanism are recognised (Aung & Masuda, 2020; Engel et *al.*, 2012; Kirk et *al.*, 2022; Wu L. B. et *al.*, 2017): (1) exclusion of Fe from roots by oxidation of soluble ferrous iron (Fe(II)) to insoluble ferric iron (Fe(III)) by oxygen released from the roots; (2) retention of Fe in root cell vacuoles and plastids, decreasing translocation to shoots; (3) partitioning of excess shoot Fe into old or less-critical tissues to prevent damage to the youngest leaves; and (4) ROS detoxification through antioxidant enzymatic reactions. Hence genotypes are broadly distinguished as Fe 'excluders' and 'includers'. There has been recent progress in understanding the molecular physiology of tolerance mechanisms, including below-ground partitioning and tissue tolerance (Aung & Masuda, 2020; Kirk et *al.*, 2022). However, there is a lack of data and understanding under true field conditions. There is a need for integrated understanding of the complex tolerance response under field conditions, with which to identify markers for use in breeding.

A further point is the role of plant mineral nutrition and interactions between Fe toxicity and nutrient deficiencies. Nutrient deficiencies both compound the Fe toxicity and are exacerbated by it (Kirk et *al.*, 2022; Sahrawat, 2004; Yamauchi T. et *al.*, 2018). Given that nutrient

deficiencies are typical of highly weathered Fe toxic soils, particularly deficiencies of phosphorus, potassium, calcium and magnesium, studies of Fe toxicity under field conditions need to consider interactions with these deficiencies.

Our aim in this study was to characterise genotypic differences in tolerance mechanisms under real field conditions, with a view to developing tailored screening methods for individual mechanisms and their interactions. We did this with a field experiment on a strongly iron-toxic soil in Madagascar with a set of contrasting genotypes provisionally identified as having a range of tolerances to Fe toxicity.

# 2. Materials and methods

# 2.1. Genotypes

There were six lowland rice genotypes in the first year of the experiment with a seventh added in the second year. Table 2 gives a tentative classification of the genotypes as tolerant or sensitive to Fe toxicity based on yield and LBS in an initial screening of 40 genotypes at three different Fe-toxic sites in Madagascar (results in Appendix 1 and images of the selected genotypes in Appendix 2), combined with the results of earlier research (Rakotoson et *al.*, 2019).

**Table 2:** Rice genotypes used in the study, their origin, their putative response to iron toxicity based on past research (Rakotoson et *al.*, 2019) and a preliminary screening at field sites in Madagascar (Materials and methods), and grain yields in the experiments reported here. Data are means of 4 replicates. Similar letters in a column indicate no significant difference by HSD-test.

Full name	Short Origin name		Supposed response to iron toxicity	Growth duration (days)		Grain yield (g m <sup>-2</sup> )	
			in on toxicity	Yr 1	Yr 2	Yr 1	Yr 2
B14339E-KA-28	KA-28	Indonesia	moderately tol.	153	144	277 <sup>b</sup>	548 <sup>a</sup>
Bahia <sup>*</sup>	Bahia	Spain	Tolerant		166		320 <sup>c</sup>
Ciherang	Ciherang	Indonesia	Sensitive	166	166	77 <sup>d</sup>	274 <sup>d</sup>
IR64	IR64	IRRI	Sensitive	153	144	160 <sup>c</sup>	317 <sup>cd</sup>
NERICA-L-43	L-43	AfricaRice	Tolerant	166	166	207°	309 <sup>cd</sup>
Tsipala 421	Tsipala	Madagascar	Tolerant	153	144	421 <sup>a</sup>	503 <sup>a</sup>
X265	X265	Madagascar	moderately tol.	153	144	446 <sup>a</sup>	<b>392</b> ⁵

\* Year 2 only

# 2.2. Experimental set up

A two-year field experiment was conducted at Sambaina, Manjakandriana District in the Central Highlands of Madagascar (18°53'12.77"S, 47°47'6.79"E) during the wet seasons (December to May) of 2019–20 and 2020–21. The soil is a Gleysol with clay loam texture, aerobic pH (in H<sub>2</sub>O) = 4.5, anaerobic pH (in H<sub>2</sub>O) = 6.7, organic carbon = 62 g kg<sup>-1</sup>, cation exchange capacity (cobalt hexamine method) = 2.4 cmol<sub>c</sub> kg<sup>-1</sup> and total Fe = 57 g kg<sup>-1</sup> of which 10 g kg<sup>-1</sup> is easily soluble on soil reduction (Rakotoson et *al.*, 2019). Weather data was collected using a Watchdog station (Spectrum Technologies Inc., Plainfield, IL, USA). In Year

1, average temperature over the season was 16.6 °C with range 10.0–20.1 °C; in Year 2, average temperature was 16.8 °C with range 8.7–21.9 °C (Appendix 3). Cumulative rainfall over the season was 242 mm in Year 1 and 742 mm in Year 2 (Appendix 3).

The design was completely randomised with six genotypes in Year 1 and seven in Year 2, and four replicates. Seeds were sown in a nursery bed next to the experimental plots and grown for 21 days. Before transplanting, the soil was saturated with irrigation water pumped from the nearby river, and then hand-ploughed to a depth of 20 cm, harrowed and manually levelled. The size of subplots containing one genotype was  $2 m^2 (1 m x 2 m)$  in Year 1 and 1.6 m<sup>2</sup> (0.8 m x 2 m) in Year 2. The plots were randomised within one block per replicate, separated by bunds. The fertilizer was broadcast and incorporated into the blocks with 50 kg ha<sup>-1</sup> nitrogen (N) as urea, 20 kg ha<sup>-1</sup> phosphorus (P) as triple superphosphate and 20 kg ha<sup>-1</sup> potassium (K) as potassium sulphate. The 21-d old seedlings were transplanted into the plots with single plants per hill and 20-cm spacing between and within rows. The plots were then submerged with at least 10 cm of standing water and this depth was maintained throughout the experiment by addition to the standing layer or removal from it. Given the lower rainfall in Year 1 (Appendix 3) roughly twice as much irrigation from the river was required as in Year 2. The field was drained a few days before harvest to make harvesting easier. The plots were weeded manually twice before booting stage.

In Year 1, the soil solution was periodically sampled through Rhizon samplers (Rhizosphere Research Products, the Netherlands) permanently installed in the plots between plant rows to 10-cm depth below the floodwater-soil boundary. There was one sampler in each of four plots on a transect perpendicular to the sloping land next to the site. Solution was withdrawn into pre-evacuated 12-cm<sup>3</sup> glass vials and kept refrigerated until analysed by atomic absorption spectrometry (Thermo Scientific iCE 3000 Series AAS) at LRI.

# 2.3. Plant measurements

Sampling was done at each of the following growth stages: tillering, booting, flowering and maturity. The following tissues were sampled at each stage: youngest leaf (YL), middle leaves (ML), old leaves (OL) and stem/leaf sheath (ST). Additionally, flag leaves (FL) were sampled at the flowering stage and panicles (PN) at maturity. Plants were collected from two randomly selected hills per plot. They were separated into component tissues immediately after sampling in the field, the tissues stored in paper bags, then oven-dried at 60 °C for 48 h and weighed.

Leaf symptoms of Fe toxicity were visually scored as a percentage of affected leaf area in the whole plant canopy on a scale from 0 (no symptoms) to 10 (100% of the leaf area affected) (L. B. Wu et *al.*, 2014). Leaf scoring was done for each sampling time except at the maturity because of difficulties in differentiation with plant senescence.

Iron, P and K concentrations were analysed in each tissue separately. Oven-dried samples were ground to a powder (Retsch ZM 200, 0.2-mm sieve), portions digested in concentrated  $HNO_3$  and  $H_2O_2$  in a microwave digestion system (MARSXpress, CEM Corporation, Mathews, NC, USA), and concentrations of Fe, P and K in the digests determined by ICP-MS (PerkinElmer NexION 350, Boston, MA, USA).

# 2.4. Data analysis

Tissue Fe contents were calculated from concentrations multiplied by dry weights (DW). Whole shoot Fe concentrations were calculated from the sum of the tissue contents divided by the whole shoot DW. Average growth rates were calculated for the vegetative stage (i.e., transplanting to booting) and reproductive stage (i.e., booting to maturity) from the changes in shoot DW divided by the time interval. Average rates of shoot Fe, P and K uptake over the vegetative and reproductive stages were calculated from the change in total shoot contents divided by the time interval. The ratio of Fe concentrations in different shoot tissues was also calculated at the booting and flowering stages, to assess the potential partitioning of Fe between shoot tissues during vegetative and reproductive growth.

Statistical analyses were performed with the R program (Version 4.2.0 <u>https://www.R-project.org/</u>). Genotype effects of all measured parameters at each growth stage were assessed by one-way analysis of variance (ANOVA) and means were compared by Tukey's HSD (Honestly Significant Differences) test ( $p \le 0.05$ ). The AGNES hierarchical algorithm in R was used for grouping of genotypes based on the degree of dissimilarity between them and clusters calculated from Euclidian distances in a matrix of concentrations and contents (Appendix 4). To allow for co-linearity, relations between grain yield or LBS and other variables were also assessed using lasso regression with the caret package (Kuhn, 2008). To explain each phenotype with the least of the other phenotypes, a model was generated using 51 samples out of the 52 total (6 genotypes in Yr 1 and 7 genotypes in Yr 2, both with 4 replicates), and one sample was used for cross-validation. This process was repeated 52 times to obtain average coefficients and the relative importance of each variable.

# 3. Results

Iron concentrations in the whole shoot (calculated from the sum of individual tissue contents divided by the whole shoot DW) ranged from approx. 600 to > 3000 mg kg<sup>-1</sup> (Figure 3A for booting stage; Appendix 5 for other stages). There were differences between genotypes, growth stages and years. But in all cases, the values far exceeded the threshold of 300 mg kg<sup>-1</sup> reported for Fe toxicity in rice (Dobermann & Fairhurst, 2000). The concentration of dissolved Fe, which we take to be predominantly Fe(II) given the much lower solubility of Fe(III), increased rapidly in the first 15 d following soil submergence and then decreased somewhat by 45 d but remained > 120 mg L<sup>-1</sup> until the field was drained before harvest (Appendix 6). There were no significant differences between the plots.

Genotypic differences in grain yield were consistent between years and largely agreed with the tentative classification in Table 2 with 'sensitive' genotypes Ciherang and IR64 having lowest yields in both years. Yields were poorer in Year 1 and maturity was delayed by 9 days in the shorter duration genotypes (Table 2). This does not appear to have been due to difference in temperature regime (Appendix 3) or water regime given that the same water regimes were maintained in both years by supplementing rainfall with irrigation. The likely explanation is that the plants in Year 2 benefited from residual P and K from Year 1. The greater rainfall in Year 2 might have brought more Fe(II) into the plots from upwelling groundwater flow, but this was not apparent in the yield or plant Fe data.

#### 3.1. Genotypic differences during vegetative growth

During vegetative growth, represented by the booting stage (approx. 12 weeks after transplanting), there were large genotypic differences in shoot Fe concentration, DW and Fe content (Figure 3A–C). Based on shoot Fe concentrations and content, we defined Tsipala, L-43 and Bahia as Fe 'excluders' (concentrations < 1400 and 850 mg kg<sup>-1</sup> in Yr 1 and 2, and contents < 20 and 15 mg plant<sup>-1</sup> in Yr 1 and 2, respectively) and the other four genotypes as 'includers' (concentrations > 1700 and 1100 mg kg– 1 in Yr 1 and 2, respectively). Shoot Fe concentrations in IR64, for example, were twice those in the excluders in both years. Differences in shoot DW between excluders and includers were not as marked as the differences in Fe concentration and content. We did not measure root Fe because, in puddled flooded soils, there is no satisfactory method for unequivocally separating true root Fe from that adsorbed on external root surfaces as 'plaque' or other soil constituents (Mori et al., 1998). By exclusion we are therefore referring to exclusion from the shoots, either by retention in roots or exclusion from them.

There was strong genotypic variation in LBS at booting stage and the differences were consistent between the years (Figure 3D). However, despite the clear separation between excluders and includers in shoot Fe concentrations and contents, this was only partially reflected in bronzing scores. Includers KA-28 and IR64 had essentially the same Fe concentration and content, but differed greatly in bronzing scores, IR64 being much more heavily affected. Evidently KA-28 and other includers with low bronzing scores had some internal tolerance mechanism or mechanisms.

We assessed Fe uptake rates (Figure 3E) and growth rates (Figure 3F) between transplanting and booting. Includer genotypes had significantly higher Fe uptake rates than excluders, but there were no corresponding differences in growth rates. Growth rates were similarly low in L-43, IR64 and KA-28 but excluder L-43 had half the Fe uptake rate of the two includers. Growth rates differed between includers, with Ciherang and X265 having greater rates than KA-28 and IR64. The smaller shoot Fe concentrations in these genotypes were therefore possibly due to a dilution effect with greater growth. This may also explain the intermediate LBS of X265. However, Ciherang had consistently high LBS, comparable to includer IR64 which did not show any growth dilution effect.



**Figure 3:** Vegetative stage data for genotypes classified as Fe 'includers' and 'excluders': (A) shoot Fe concentration (sum of individual tissue contents divided by whole shoot DW), (B) shoot DW, (C) shoot Fe content, (D) leaf bronzing score, (E) shoot Fe uptake rate and (F) shoot growth rate. A–D are at booting stage; E–F are from transplanting to booting. Data are means  $\pm$  standard errors (n = 4). Common letters indicate no significant difference by Tukey's HSD test.

Vegetative growth

## 3.2. Partitioning between shoot tissues during vegetative growth

During vegetative growth, Fe concentrations were much greater in stems and old leaves (> 2000 mg kg<sup>-1</sup> in Yr 1 and 1200 mg kg<sup>-1</sup> in Yr 2) than in young leaves (typically 500–800 mg kg<sup>-1</sup>) (Figure 4A). Excluders L-43 and Bahia had significantly lower Fe concentrations in all tissues compared to includers, whereas Tsipala only had lower concentrations in the stem. This may explain Tsipala's higher LBS because its leaf Fe concentrations were high. There were corresponding differences in Fe content. About 70% of total shoot Fe was in stems, whereas young leaves only contained 3% on average (Figure 4B). The differences between excluders and includers were most evident for stem Fe content, which was typically 50% smaller in excluders.

Table 3 shows the ratios of Fe concentrations in different shoot tissues between genotypes. KA-28 and L-43 consistently had the lowest ratio of Fe in young to old leaves and, to a smaller extent, in middle to old leaves. KA-28, L-43 and IR64 had the lowest ratios in young and middle leaves and stem, suggesting that those genotypes prevent Fe accumulation in their young and middle leaves by storing it in old leaves and stems. In addition, the lower bronzing scores of KA-28 than IR64 (Figure 3D), despite similar Fe concentration, content, and partitioning, suggests some additional tissue tolerance in KA-28.

Genotype	Fe concentration ratio							
	YL	/OL	ML	/OL	YL/ST		ML/ST	
	Yr 1	Yr 2	Yr 1	Yr 2	Yr 1	Yr 2	Yr 1	Yr 2
Includers								
X265	0.30 <sup>ab</sup>	0.61 <sup>a</sup>	0.60 <sup>a</sup>	1.35 <sup>a</sup>	0.35 <sup>b</sup>	0.47 <sup>b</sup>	0.69 <sup>b</sup>	1.0.5 <sup>c</sup>
Ciherang	0.25 <sup>b</sup>	0.34 <sup>c</sup>	0.43 <sup>b</sup>	0.78 <sup>b</sup>	0.30 <sup>b</sup>	0.57 <sup>b</sup>	0.50 <sup>c</sup>	1.29 <sup>b</sup>
KA-28	0.13°	0.27 <sup>de</sup>	0.31 <sup>b</sup>	0.51 <sup>d</sup>	0.16 <sup>c</sup>	0.29 <sup>c</sup>	0.39 <sup>c</sup>	0.53 <sup>d</sup>
IR64	0.30 <sup>ab</sup>	0.41 <sup>b</sup>	0.71 <sup>a</sup>	0.85 <sup>b</sup>	0.18 <sup>c</sup>	0.30 <sup>c</sup>	0.41 <sup>c</sup>	0.62 <sup>d</sup>
Excluders								
Tsipala	0.34ª	0.33 <sup>cd</sup>	0.63ª	0.61°	0.91ª	1.10 <sup>a</sup>	1.68ª	2.03ª
L-43	0.16 <sup>c</sup>	0.24 <sup>e</sup>	0.41 <sup>b</sup>	0.44 <sup>d</sup>	0.16 <sup>c</sup>	0.26 <sup>c</sup>	0.41°	0.47 <sup>d</sup>
Bahia		0.34 <sup>c</sup>		0.62 <sup>c</sup>		0.55 <sup>b</sup>		1.03 <sup>c</sup>

**Table 3:** Ratios of Fe concentrations in different plant parts in Includer genotypes at booting stage. Values are means of 4 replicates. Similar letters in a column indicate no significant difference by HSD-test; lowest values are highlighted in green. YL = youngest leaf, ML = middle leaves, OL = old leaves, ST = stem/leaf sheath.



Vegetative growth

**Figure 4:** Iron concentrations and contents in above-ground tissues at booting stage. Whole shoot Fe concentrations were calculated from the sum of the individual tissue contents divided by the whole shoot weight. Data are means  $\pm$  standard errors (n = 4). Common letters indicate no significant difference between genotypes for a given tissue by Tukey's HSD test.

### 3.3. Genotypic differences during reproductive growth and at maturity

There were genotypic differences in the shoot Fe concentration, DW and Fe content, as during vegetative growth (Figure 5A–C). Whole shoot Fe concentrations at maturity remained very high (Figure 5A) but differences between genotypes decreased and the distinction between includers and excluders detected at the booting stage was no longer apparent as KA-28 had lower and Tsipala higher than expected concentrations. Although shoot Fe content did not differ between includers and excluders (Figure 5C), shoot biomass has a stronger influence on it (Figure 5B). Over both years, genotypes Ciherang and IR64 consistently had the lowest shoot biomass (< 20 g plant<sup>-1</sup>) and shoot Fe content (< 42 and < 33 mg plant<sup>-1</sup> in Yr 1 and 2, respectively).

Leaf symptoms differed between genotypes during reproductive growth (Figure 5D) and includers Ciherang and IR64 had the highest LBS, as they did during the vegetative stage, whereas includer KA-28 maintained its apparent tissue tolerance and showed little bronzing. Tsipala, classified as an excluder during the vegetative stage but not being able to maintain this during the reproductive stage, had a very high bronzing score.

The reversal between includers and excluders from vegetative to reproductive stages was even more pronounced for Fe uptake rates: values were highest in Tsipala and lowest in Ciherang and IR64 (Figure 5E). Rates of Fe uptake by excluder genotypes increased more than two-fold from vegetative to reproductive stages, indicating that exclusion mechanisms were less effective during reproductive growth. As a group, includers were inconsistent with generally increasing Fe uptake rates in KA-28 and X265 but decreasing rates in Ciherang and IR64. Low Fe uptake rates in these two genotypes was likely due to their very low growth rates (Figure 5F).



**Reproductive growth** 

**Figure 5:** Reproductive stage data: (A) shoot Fe concentration, (B) shoot DW, (C) shoot Fe content, (D) leaf bronzing score, (E) shoot Fe uptake rate and (F) shoot growth rate. A, B, C are at maturity; D is at flowering; E–F are from booting to maturity. Data are means ± standard errors (n = 4). Common letters indicate no significant difference by Tukey's HSD test.

# 3.4. Partitioning between shoot tissues during reproductive growth

Iron concentration varied greatly between shoot tissues and genotypes during reproductive growth (Figures. 6A and 6C). The stem and old leaves had the highest concentrations (> 1200 and 800 mg kg<sup>-1</sup> in Yr 1 and 2, respectively), and the flag and young leaves the lowest. In both

years, KA-28 had the lowest Fe concentration in flag leaves and Tsipala had the highest. There were corresponding differences in Fe content (Figures 6B and 6D).



Reproductive growth

**Figure 6:** Iron concentrations and contents in above-ground tissues at flowering stage. Data are means  $\pm$  standard errors (n = 4). Common letters indicate no significant difference between genotypes for a given tissue by Tukey's HSD test.

Table 4 shows the ratios of Fe concentrations in different shoot tissues in the different genotypes during reproductive growth. Excluders L43, Bahia and includer KA-28 consistently had the lowest ratio of Fe in flag to old leaves and in flag leaves to stems. Whereas excluder Tsipala has a similar ratio to other includers, and IR64 did not maintain the Fe compartmentalization away from young leaves evident during vegetative growth (Table 3). This suggests that L-43, Bahia, and KA-28 were able to maintain compartmentalization mechanisms into reproductive growth but IR64 was not.

**Table 4:** Ratios of Fe concentrations in different plant parts in includer genotypes at flowering stage. Values are means of 4 replicates. Similar letters in a column indicate no significant difference by HSD-test; lowest values are highlighted in green. FL= Flag leaf, YL = youngest leaf, OL = old leaves, ST = stem/leaf sheath.

Genotype	Fe concentration ratio							
_	FL/OL		YL/OL		FL/ST		YL/ST	
	Yr 1	Yr 2	Yr 1	Yr 2	Yr 1	Yr 2	Yr 1	Yr 2
Includers								
X265	0.56 <sup>a</sup>	0.31 <sup>b</sup>	0.88 <sup>a</sup>	0.46 <sup>bc</sup>	0.80 <sup>b</sup>	0.53 <sup>a</sup>	1.25ª	0.78 <sup>a</sup>
Ciherang	0.58 <sup>a</sup>	0.50 <sup>a</sup>	0.71 <sup>ab</sup>	0.69 <sup>a</sup>	0.64 <sup>b</sup>	0.37 <sup>bc</sup>	0.77°	0.50 <sup>b</sup>
KA-28	0.37 <sup>b</sup>	0.31 <sup>b</sup>	0.56 <sup>bc</sup>	0.57 <sup>ab</sup>	0.56 <sup>b</sup>	0.29 <sup>c</sup>	0.85 <sup>bc</sup>	0.53 <sup>b</sup>
IR64	0.61 <sup>a</sup>	0.54ª	0.77 <sup>ab</sup>	0.71ª	0.87 <sup>ab</sup>	0.45 <sup>ab</sup>	1.11 <sup>ab</sup>	0.60 <sup>ab</sup>
Excluders								
Tsipala	0.56 <sup>a</sup>	0.46 <sup>a</sup>	0.58 <sup>bc</sup>	0.69 <sup>a</sup>	1.20 <sup>a</sup>	0.41 <sup>b</sup>	1.22 <sup>a</sup>	0.62 <sup>ab</sup>
L-43	0.27 <sup>b</sup>	0.19 <sup>c</sup>	0.36 <sup>c</sup>	0.20 <sup>d</sup>	0.64 <sup>b</sup>	0.46 <sup>ab</sup>	0.84 <sup>bc</sup>	0.70 <sup>ab</sup>
Bahia		0.13 <sup>c</sup>		0.35 <sup>cd</sup>		0.28 <sup>c</sup>		0.53 <sup>b</sup>

#### 3.5. P and K uptake during vegetative and reproductive growth

Table 4 shows leaf P and K concentrations during vegetative and reproductive growth. In all the genotypes at both growth stages, concentrations of both nutrients were suboptimal and close to or below deficiency levels. In general, P concentrations were greater in the reproductive than the vegetative stage, whereas K concentrations were smaller. The differences between genotypes were not very consistent for either nutrient at either growth stage.

We calculated rates of P and K uptake during vegetative growth (transplanting to booting) and reproductive growth (booting to maturity) from the changes in shoot contents (Figure 7). Includers Ciherang and X265 had higher P uptake rates than the other genotypes during vegetative growth in both years (Figure 7A). But the trends were different during reproductive growth (Figure 7C), with includers Ciherang and IR64 having low rates in both years, and excluders Tsipala and Bahia having the highest rates. The latter were more than double the corresponding vegetative stage rates. Rates of K uptake also differed between genotypes during vegetative growth (Figure 7B), and, as for P uptake, Ciherang and X265 had the highest rates in both years. Rates of K uptake during reproductive growth also differed between genotypes (Figure 7D). Includers (except KA-28 in Yr 1) had lower K uptake rates during reproductive growth, whereas excluders tended to maintain their uptake rates.

**Table 5:** Concentrations of P and K in youngest leaf (YL) at booting and flag leaf (FL) at flowering. Values are means of 4 replicates. Similar letters in a column indicate no significant difference by HSD-test. For comparison, optimal (deficiency) values are 2-4 (1.0) and 2-3 (1.8) g P kg<sup>-1</sup> in YL at B and FL at F, respectively, and 18–26 (15) and 15–20 (12) g K kg<sup>-1</sup> in YL at B and FL at F (Dobermann & Fairhurst, 2000).

Ganatura	Рс	oncentrat	ion (g kg <sup>-</sup>	<sup>1</sup> )	K concentration (g kg <sup>-1</sup> )			
Genotype	YL at be	ooting	FL at flo	wering	YL at b	ooting	FL at flo	owering
-	Yr 1	Yr 2	Yr 1	Yr 2	Yr 1	Yr 2	Yr 1	Yr 2
Includers								
X265	1.41 <sup>a</sup>	1.32 <sup>b</sup>	1.32 <sup>cd</sup>	1.84 <sup>a</sup>	10.37 <sup>d</sup>	10.28 <sup>b</sup>	10.88 <sup>ab</sup>	9.91 <sup>e</sup>
Ciherang	1.24 <sup>abc</sup>	1.46 <sup>a</sup>	1.62 <sup>abc</sup>	1.60 <sup>b</sup>	14.09 <sup>a</sup>	12.65 <sup>a</sup>	12.48 <sup>a</sup>	10.50 <sup>de</sup>
KA-28	1.15 <sup>bcd</sup>	1.27 <sup>bc</sup>	1.79 <sup>a</sup>	1.40 <sup>d</sup>	13.35 <sup>ab</sup>	11.71 <sup>ab</sup>	11.12 <sup>ab</sup>	10.54 <sup>cde</sup>
IR64	1.03 <sup>d</sup>	1.55 <sup>a</sup>	1.70 <sup>ab</sup>	1.84 <sup>a</sup>	11.57 <sup>cd</sup>	11.90 <sup>ab</sup>	12.05 <sup>a</sup>	11.64 <sup>bcd</sup>
Excluders								
Tsipala	1.04 <sup>cd</sup>	1.08 <sup>d</sup>	1.46 <sup>bc</sup>	1.51 <sup>bc</sup>	12.57 <sup>bc</sup>	10.83 <sup>ab</sup>	9.97 <sup>bc</sup>	11.79 <sup>bc</sup>
L-43	1.25 <sup>ab</sup>	1.28 <sup>bc</sup>	1.05 <sup>d</sup>	1.48 <sup>cd</sup>	12.00 <sup>bc</sup>	11.77 <sup>ab</sup>	8.65 <sup>c</sup>	12.29 <sup>ab</sup>
Bahia		1.21 <sup>c</sup>		1.51 <sup>bc</sup>		11.34 <sup>ab</sup>		13.45 <sup>a</sup>

# 3.6. Relationships with grain yield

Grain yield was not correlated with Fe uptake rate during vegetative growth (Figure 8A) but it was correlated with Fe uptake rate during reproductive growth (Figure 8B). Hence, genotypes with high Fe uptake rate (KA-28, Bahia, L-43, Tsipala, and X265) had high yield, whereas genotypes with low Fe uptake rate (Ciherang, IR64) had low yield.

Greater leaf bronzing was associated large high Fe concentrations in flag leaves at flowering (Figure 9B) but there was no consistent association between leaf bronzing and grain yield (Figure 9A). While Ciherang and IR64 with very high bronzing had low yields, Tsipala maintained high yields despite its high canopy bronzing score. The results of the lasso regression (Appendix 8 and 9), which we carried out to allow for co-linearity of variables, were consistent with the absence of positive correlation between grain yield and LBS at flowering stage. The factors that explain grain yield and LBS did not have any overlap, indicating that different physiological mechanisms underlie grain yield and LBS.



**Figure 7:** Rates of P and K uptake into shoots (A) and (B) during vegetative growth (tillering to booting), respectively, and (C) and (D) during reproductive growth (booting to maturity), respectively. Data are means  $\pm$  standard errors (n = 4). Common letters indicate no significant difference by Tukey's HSD test.



**Figure 8:** Relationship between grain yield and Fe uptake rate during (A) vegetative and (B) reproductive stages. Data are means ± standard errors (n = 4).



**Figure 9:** Relationships between (A) grain yield and (B) flag leaf Fe concentration and leaf bronzing score (LBS) of the canopy at flowering stage for the 6 genotypes in Year 1 and 7 genotypes in Year 2. Data are means  $\pm$  standard errors (n = 4).

# 4. Discussion

# 4.1. Exclusion, compartmentalization, and other tolerance mechanisms

The results show that multiple tolerance mechanisms were operating in the different genotypes, as summarised in Figure 10. Firstly, there was a clear separation between Fe includers and excluders during vegetative growth based on shoot Fe concentrations and contents irrespective of differences in growth. Second, some of the genotypes sequestered excess Fe in older tissues to protect younger leaves. Third, in addition, some of the genotypes had specific tissue tolerance mechanisms given differences in LBS for the same tissue Fe concentration. Fourth, tolerant genotypes were able to sustain their tolerance from vegetative stages into reproductive growth despite having apparently abandoned their Fe exclusion mechanism. Hence, the distinction between excluders and includers based on concentrations and contents did not persist into reproductive growth.

It is informative to compare the sensitive genotype IR64 with the tolerant KA-28. They had very similar growth and Fe concentrations, contents and tissue partitioning during vegetative stages, but they had very different LBS, indicating differences in tissue tolerance. Then, after booting, they diverged with KA-28 growing well and producing high grain yields but IR64 deteriorating and having much poorer growth and yield. What chain of events could explain these differences? Evidently IR64 was so damaged by Fe toxicity by the booting stage that it was unable to recover.

		Tole	Sensitive	
		Excluders (Tsipala, L-43, Bahia)	Includers (KA-28, X265)	Includers (IR64, Ciherang)
Vegetative growth	Characteristics	<ul> <li>Low shoot Fe conc.</li> <li>Low LBS</li> <li>High biomass</li> </ul>	<ul> <li>High shoot Fe conc.</li> <li>Low LBS</li> <li>High biomass</li> </ul>	<ul> <li>High shoot Fe conc.</li> <li>High LBS</li> <li>Low/high biomass</li> </ul>
	Tolerance mechanisms	Exclusion	<ul> <li>Tissue tolerance</li> <li>Compartmentalization</li> </ul>	
Reproductive growth	Characteristics	<ul> <li>Higher shoot Fe concort</li> <li>Higher LBS</li> <li>High Biomass</li> </ul>	<ul> <li>High shoot Fe conc.</li> <li>High LBS</li> <li>Low biomass</li> </ul>	
	Tolerance mechanisms	<ul> <li>Tissue tolerance</li> <li>Compartmentalization</li> </ul>		
		Hign gr	Low grain yield	

**Figure 10:** Summary of tolerance mechanisms in the different genotypes. LBS = leaf bronzing score.

Another interesting genotype is Tsipala which excluded Fe during vegetative growth but lacked tolerance mechanisms at the maturity stage according to our indices. Based on flag leaf Fe concentration and LBS, it should have performed very poorly, but in fact it produced good yields. Possibly Tsipala has tissue tolerance mechanisms that we have not directly measured. Or it may be sufficient to keep the plant healthy during the vegetative stages by Fe exclusion and limited tissue damage, and that grain filling may proceed relatively unimpeded in an otherwise seemingly affected plant. In this regard it would be interesting to compare the effects

of Fe toxicity with the loss of photosynthetic capacity occurring naturally during senescence. By contrast, the sensitive genotype Ciherang produced high biomass during vegetative growth, despite high shoot Fe concentrations and LBS, but it did not maintain good growth into the reproductive stages. Evidently Ciherang lacks tissue tolerance or compartmentalization mechanisms and was so damaged by Fe during the earlier stages that it could not recover.

Some of the genotypes stored excess Fe in stem/leaf sheath tissues and/or old leaves, particularly the tolerant includer KA-28 and excluder L-43 at booting, and Bahia at flowering. Presumably smaller Fe concentrations in younger, more active tissues allows greater net photosynthesis. Likewise, Engel et *al.* (2012) found Fe retention in leaf sheaths/stems was important in includers. Compartmentalization into stems and old leaves may initially work by storage of Fe in vacuoles (Moore K. L. et *al.*, 2014) or within ferritin proteins (Stein et *al.*, 2009) but plants may later simply sacrifice old leaves if they are no longer essential source leaves.

The positive relation between grain yield and Fe uptake rates during reproductive growth (Figures 5 and 8) is seemingly counter-intuitive. If greater Fe uptake in the absence of exclusion mechanisms during the reproductive stages is simply due to greater growth rates and maintaining high growth rates lead to greater grain yield, then a positive correlation would follow. For KA-28 and X265 (in Yr 2) high Fe uptake rates were coupled with greater growth rates (Figure 5) and this apparently led to a dilution effect.

Genotypes differed in plant maturity dates with Ciherang, L-43 and Bahia having significantly longer growth duration than the others (Appendix 7). Yields of the longer duration genotypes may have been affected by low temperatures (Appendix 3). Low temperatures are known to impair rice yields in the Central Highlands of Madagascar (Dingkuhn et *al.*, 2015). Hence the tolerant genotypes L-43 and Bahia might otherwise have yielded a little better. This would have established a stronger positive association between grain yield and Fe exclusion during the vegetative stages and Fe sequestration in old leaves during reproductive stages (Table 4) than currently detected.

#### 4.2. Changes between growth stages

Tolerant includers X265 and KA-28 continued to take up Fe during reproductive growth at comparable rates to vegetative growth, and sensitive includers Ciherang and IR64 decreased their uptake. By contrast, the excluders had low uptake rates during vegetative growth but higher rates during reproductive growth. This suggest that, for some reason, exclusion mechanisms were relaxed during reproductive growth, allowing more Fe into roots and shoots. Presumably this was because continuing Fe exclusion during reproductive growth had some deleterious effect or effects that exceeded the value of continuing Fe exclusion.

Why should Fe exclusion mechanisms break down during reproductive growth? Possibly, the energy costs of maintaining exclusion are increasingly prohibitive during reproductive growth and grain filling. In general, there is a logarithmic relation between root biomass and total plant biomass such that progressively less photosynthate is allocated to roots as the plant grows (Yoshida, 1981). Further, Fe exclusion at the root surface depends on the development of aerenchyma in the root cortex and suberization of epidermal layers in the basal zones to form a barrier to  $O_2$  loss, allowing a greater length of root to be aerated and O2 release into the rhizosphere in apical zones and lateral roots (Yamauchi T. et *al.*, 2018). These processes are metabolic and consume energy (Tadano, 1975; Yamauchi T. et *al.*, 2018) in competition with

other processes. We hypothesize that the benefits of devoting energy to exclusion mechanisms outweigh their cost during the vegetative stages, whereas later on, they are in direct competition with grain filling and given that the sink-strength of roots decreases over time, insufficient energy is allocated to maintain these mechanisms after the vegetative stages. A further possibility is that Fe exclusion interferes with the uptake of other essential mineral nutrients.

#### 4.3. Interactions with mineral nutrition

The unfertilized soil is highly deficient in P, K and other nutrients (Rakotoson et *al.*, 2019), which is typical of highly weathered, Fe toxic soils in the inland valleys of sub-Saharan Africa (Kirk et *al.*, 2022). The plant P and K concentrations were close to or below deficiency limits during both vegetative and reproductive growth, and there were differences in uptake rates between genotypes. However, the concentration differences were much smaller than the differences in growth rates, so growth rates evidently drove the differences in uptake rates. This suggests genotypic responses to Fe toxicity were the more important constraints to growth. Better growth in tolerant genotypes may dilute tissue P and K concentrations. Nonetheless, exclusion of Fe(II) from roots by oxidizing it in the rhizosphere may impede P and K uptake, as we now discuss, and excluder genotypes may therefore make things worse for themselves.

Three processes in the rice rhizosphere in Fe toxic soils affect the solubilities and hence plantavailabilities of nutrient ions (Begg et al., 1994; Kirk et al., 2019). First, oxidation of Fe(II) by O2 diffusing down through aerenchyma and released from roots results in accumulation of insoluble ferric hydroxide on and near root surfaces and generation of acidity: 4Fe<sup>2+</sup> + O<sub>2</sub> +  $10H_2O = 4Fe(OH)_3 + 8H^+$ . Second, release of acidity (H+ ions) from roots to balance excess intake of nutrient cations (especially  $NH_4^+$  in the anoxic flooded soil) over anions tends to further decrease the rhizosphere pH. Third, uptake of dissolved CO<sub>2</sub> into roots and its venting through the aerenchyma decreases the concentration of the acid H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> near the root and to some extent offsets the acidity generated in the other two processes. Phosphate anions and  $K^+$  cations may both be immobilized on freshly precipitated  $Fe(OH)_3$  in the rhizosphere, depending on the pH (Jianguo & Shuman, 1991; Saleque & Kirk, 1995). Further, removal of exchangeable Fe<sup>2+</sup> as it is oxidized will mean a greater proportion of surface exchange sites is occupied by other cations such as K<sup>+</sup>, so decreasing K<sup>+</sup> solubility and mobility. The cation exchange capacity will tend to decrease as the pH decreases. But if the pH decreases below about 6.0, the concentration of bicarbonate anions (formed from dissolved CO<sub>2</sub>) balancing cations in solution will decrease. So overall K<sup>+</sup> mobility and uptake will decrease with Fe oxidation and acidification. However, given the above complexities, a range of responses should be expected in different soils (Kirk et al., 2022).

Hence relaxation of Fe exclusion during reproductive growth might allow greater P and K uptake to meet increased demand during grain filling. The plant P supply is most important during early rice growth stages to promote tillering, root growth and flowering, but K uptake needs to be maintained through reproductive growth (Dobermann & Fairhurst, 2000). Phosphorus deficiency may delay phenological development by up to a month (Dobermann & Fairhurst, 2000; Vandamme et *al.*, 2018). Under chronic low-level exposure to Fe toxicity, slower growth might mean less Fe is accumulated in the plants, and they have longer to acclimatize to it. On the other hand, delayed phenology may expose the plants to other problems later in the season, such as low temperature.

# 4.4. Implications for rice breeding

This study identified genotypes possessing complementary tolerance mechanisms, with L43 being a potential donor for Fe exclusion mechanisms and KA-28 for Fe compartmentalization and tissue tolerance. Further physiological and genetic studies are needed to understand the underlying mechanisms. To date only minor loci have been identified for each mechanism (Matthus et *al.*, 2015; Melandri et *al.*, 2021; Wairich et *al.*, 2021). This may indicate multiple genes control each trait. However, it is also likely that improving phenotyping protocols to specifically screen for a single mechanism without the confounding effects of other mechanisms would result in the detection of QTL with strong enough effects to be applied in marker assisted selection (MAS). Until this is achieved crosses with donors such as L-43 and KA-28, ideally with local varieties already possessing the complementary tolerance mechanism, would be a suitable short-term strategy.

The example of local varieties Tsipala and X265 furthermore indicate that relatively high yields can be achieved despite considerable visible leaf damage. This poses the question to what extent the visual leaf damage reduces photosynthetic rates during grain filling and what degree of damage would be permissible without incurring a yield penalty. As far as we are aware, this has yet to be investigated directly. Presumably the answer will depend on the expected yield level, and it is likely that a target yield of 4-5 t ha<sup>-1</sup>, which is around 25–40% above the national average of many African countries, can be achieved with plants that exhibit strong symptoms of Fe toxicity towards maturity. To achieve target yields near the potential yield of rice in the humid tropics (i.e., 7-8 t ha<sup>-1</sup> during the wet season) may require a far-more healthy plant with highly productive source leaves. To what extent plant defences against Fe toxicity need to be maintained during the reproductive stage to maintain such highly productive source leaves and whether the competition for resources between upholding defences and filling a large sink is prohibitive should be investigated further.

# 5. Conclusions

1. Higher grain yields of tolerant genotypes compared to sensitive ones could be attributed mainly to the plants being kept healthy during the vegetative stages. This was achieved either by reducing Fe uptake (exclusion) or by minimizing the effect of excess Fe uptake through compartmentalization of Fe in older leaves and stems and through higher tissue tolerance.

2. Exclusion mechanisms were relaxed during reproductive growth, leading to increased Fe accumulation in shoots, even in excluder genotypes. But tolerant genotypes were nonetheless able to grow well, and we attribute this to a combination of Fe compartmentalization and tissue tolerance, so that grain filling could proceed relatively unimpeded by increasingly high tissue Fe concentrations.

3. There was no relation between grain yield and visual symptoms, and some genotypes produced high yields despite having strong visual symptoms. Selection for Fe toxicity tolerance based on visual symptoms, particularly at the seedling stage, is therefore overly simplistic and only suitable to identify highly sensitive genotypes, but not for the selection of most tolerant genotypes. The presence or absence of visual symptoms in different tissues may nevertheless be of interest in the detailed study of specific tolerance mechanisms involving compartmentalization or true tissue tolerance.

4. To identify useful donors and markers for breeding it is important to develop screening protocols that capture the individual tolerance mechanisms, keeping in mind that plant growth stages appear to have a strong effect on their relative importance, expression, and possible interaction. It is therefore important to allow for changes between growth stages, as well as interactions with mineral nutrition which may change over time.

5. The intensity and dynamics of Fe toxicity are highly site specific and highly variable between years depending on the onset and intensity of rains. Varieties that combine multiple stress tolerance mechanisms will be more resilient than those with single mechanisms. We have identified candidate donors for efficient Fe compartmentalization and tissue tolerance (KA-28), for Fe exclusion (L-43) and for tolerance despite appearing sensitive (Tsipala). Further physiological and genetic studies should investigate underlying causes and genetic factors in these with a view to identifying markers and genes for pyramiding in broadly tolerant genotypes.

# Magnesium supply alleviates iron toxicity-induced leaf bronzing in rice through exclusion and tissue-tolerance mechanisms\*

\* This chapter is adapted from:

Rajonandraina, Toavintsoa, Yoshiaki Ueda, Matthias Wissuwa, Guy JD Kirk, Tovohery Rakotoson, Hanna Manwaring, and Andry Andriamananjara. "Magnesium supply alleviates iron toxicity-induced leaf bronzing in rice through exclusion and tissue-tolerance mechanisms." *Frontiers in Plant Science* 14 (2023): 1213456.

#### Résumé étendu

**Contexte :** Le riz, une source alimentaire essentielle pour plus de la moitié de la population mondiale, voit sa demande croître en Afrique subsaharienne, stimulée par la croissance démographique et l'évolution des préférences alimentaires. Cependant, les rendements rizicoles dans cette région restent faibles par rapport à leur potentiel, freinés par l'appauvrissement des sols en nutriments et la toxicité ferreuse dans les rizières inondées. Si la sélection de variétés de riz tolérantes à la toxicité ferreuse représente une approche prometteuse, les contraintes en ressources limitent souvent l'accès des agriculteurs à ces cultivars améliorés. Les solutions existantes, comme le drainage et le chaulage, s'avèrent coûteuses et laborieuses. De plus, la compréhension des interactions entre la toxicité ferreuse et les carences en d'autres nutriments, tel le magnésium, reste limitée. Des études récentes suggèrent qu'une carence en magnésium pourrait exacerber les dommages causés par la toxicité ferreuse. Cependant, les mécanismes exacts et l'influence de l'apport de magnésium sur la réponse à cette toxicité restent encore à éclaircir.

**Objectif :** Cette recherche vise à combler ce déficit de connaissances en étudiant, en conditions réelles de culture, les effets de l'apport d'engrais magnésien et potassique sur la tolérance du riz à la toxicité ferreuse. L'objectif est également d'élucider les mécanismes potentiels sous-jacents à l'influence du magnésium.

**Méthodes** : Une expérimentation a été menée sur sept cultivars de riz présentant des degrés de tolérance à la toxicité ferreuse variables. L'expérimentation s'est déroulée sur une rizière irriguée pendant la saison humide (2020-2021) sur les hautes terres centrales de Madagascar. Le site choisi était un champ à sol gley fortement altéré, caractérisé par un pH bas et des teneurs élevées en fer facilement soluble. Un dispositif expérimental en split-plot avec huit traitements d'engrais, sept variétés et quatre répétitions a été mis en place. Les traitements fertilisants comprenaient un témoin (sans fertilisation), Mg, NK, NKMg, NP, NPK, NPMg, et NPKMg. Tout au long de la saison de croissance, le score des symptômes foliaires a été évalué visuellement sur chaque sous-parcelle afin de quantifier la gravité de la toxicité ferreuse. À différents stades de développement, des parties aériennes ont été collectées pour l'analyse minérale des teneurs en fer, magnésium et potassium. Des analyses statistiques ont été réalisées à l'aide d'une ANOVA à effets mixtes ( $\alpha = 0,05$ ) pour analyser les effets des traitements.

**Résultats :** L'apport de magnésium a significativement réduit les symptômes de toxicité ferreuse, avec une diminution de 18 % des symptômes foliaires. Cependant, il n'a pas eu d'effet sur le rendement en biomasse ni en grains. En revanche, l'apport de potassium n'a eu aucun effet sur la toxicité ferreuse, mais a significativement augmenté la biomasse aérienne (17 % de poids sec en plus) et le rendement en grains (15 % de rendement en plus). Ces résultats suggèrent que le magnésium atténue la toxicité ferreuse sans affecter directement la croissance, tandis que le potassium stimule la croissance avec un effet minimal sur la toxicité ferreuse. Le traitement au magnésium a entraîné une diminution de la concentration et de la teneur totales en fer dans les parties aériennes, à tous les stades de croissance. Cette observation suggère une exclusion accrue du fer au niveau de la plante entière, confirmée par la diminution générale de l'accumulation de fer dans tous les organes végétaux. Cependant, l'analyse de plusieurs génotypes a révélé une atténuation des symptômes de toxicité au fer sans nécessairement observer une diminution concomitante de la concentration en fer. Cette observation suggère qu'un apport accru en magnésium peut également conférer une tolérance au niveau tissulaire.

**Conclusion :** Cette étude contribue à une meilleure compréhension de l'atténuation des symptômes foliaires (brunissement) induits par la toxicité au fer chez le riz. Nos résultats indiquent que l'application d'engrais magnésiens constitue une stratégie prometteuse pour la gestion de la toxicité ferreuse. Le traitement au magnésium réduit significativement le brunissement foliaire, un symptôme clé de la toxicité au fer, sans compromettre la croissance ni le rendement des cultures. De plus, les recherches suggèrent que le magnésium pourrait employer des mécanismes supplémentaires qui vont au-delà de la simple limitation de l'absorption du fer. L'efficacité du magnésium varie cependant selon les variétés de riz, soulignant la nécessité de recherches approfondies pour adapter les stratégies d'application du magnésium aux différents cultivars. Cela permettra de maximiser les avantages de cette approche pour la production de riz en situation de stress ferrique en Afrique subsaharienne.

# 1. Introduction

Rice is a staple crop for more than half the world's population and its consumption is steadily increasing with population growth (Arouna et *al.*, 2021). Demand is increasing particularly rapidly in Sub-Saharan Africa (SSA) where economic growth, urbanization and changes in lifestyle have increased people's preference for rice (Wopereis et *al.*, 2013). Despite increases in production in SSA since the 1960s (Arouna et *al.*, 2021), yields and production are relatively low and more than 40% is imported accounting for a third of the global rice trade (FAO, 2017). Past production increase has been due to expansion of the cultivated area (Tsujimoto et *al.*, 2019) though yields per unit area have also increased recently (Wopereis et *al.*, 2013). Current mean yields (2.1 t ha<sup>-1</sup>) are far below potential yields under prevailing agro-climatic conditions (7.5–10.8 t ha<sup>-1</sup>) due to various abiotic and biotic constraints as well as a lack of appropriate technologies (Tsujimoto et *al.*, 2019). Increasing productivity under adverse conditions and closing the gap between actual and potential yields are key to increasing rice productivity in SSA.

Major abiotic constraints to rice in SSA are the prevalence of highly weathered, nutrient depleted soils and the nutritional disorder iron (Fe) toxicity (Becker & Asch, 2005; van Oort, 2018). Iron toxicity occurs exclusively under submerged soil conditions where exclusion of oxygen favors generation of soluble ferrous iron (Fe(II)) from insoluble ferric iron (Fe(III)). The toxicity is exacerbated by low pH and low nutrient status, and hence it is widespread in the highly weathered soils that typify inland valleys in SSA which otherwise have great potential for rice (Becker & Asch, 2005; Kirk et *al.*, 2022). Iron toxicity typically results in >15% rice yield loss and sometimes complete loss (Audebert & Fofana, 2009; Sahrawat, 2004). Although field management such as mid-season drainage and liming may reduce Fe(II) availability and mitigate Fe toxicity (Becker & Asch, 2005; Fageria et *al.*, 2008), such measures are labor intensive and incur high costs. Hence, they are unlikely to be implemented in the resource-poor countries in SSA where Fe toxicity is particularly problematic. Development of tolerant germplasm is a more promising approach.

The presence of excess soluble Fe(II) in soil causes overloading of Fe in plants. Excess Fe disrupts the redox status, causes oxidative stress and foliar damage referred to as leaf bronzing, and retards growth (Aung & Masuda, 2020). Tolerance mechanisms include exclusion of excess Fe from shoots by restricting uptake into roots or by retention in roots, thus reducing root-to-shoot translocation. Genotypes lacking such Fe exclusion mechanisms may have different mechanisms to limit tissue damage despite excessive Fe concentrations (Aung & Masuda, 2020; Engel et al., 2012; Matthus et al., 2015). Such 'includer' mechanisms are further classified into 'avoidance', which involves compartmentalization of Fe in older tissues, and 'tissue tolerance', which involves storage of Fe in less bioactive states such as by sequestration in vacuoles and detoxification of reactive oxygen species (ROS) formed under excess Fe (Aung & Masuda, 2020; L. B. Wu et al., 2017). This suggests further genetic improvement of tolerance may be achieved by pyramiding genes for distinct tolerance mechanisms. Quantitative trait loci (QTLs) and candidate genes for Fe toxicity tolerance in rice have been identified (Diop et al., 2020; Dufey et al., 2015a; Dufey et al., 2009; Dufey et al., 2015b; Matthus et al., 2015; Melandri et al., 2021; Wairich et al., 2021; Wu L. B. et al., 2014). However, studies so far suggest that many small effect loci underlie each of the above mechanisms, as well as overall Fe toxicity tolerance.

A major problem in understanding tolerance mechanism under field conditions is interactions between Fe toxicity and the nutrient deficiencies that are prevalent in much of SSA, particularly deficiencies of phosphorus (P), potassium (K), calcium (Ca) and magnesium (Mg) (Gao et *al.*, 2014; Howeler, 1973; Li H. et *al.*, 2001; Suriyagoda et *al.*, 2017). Of these, interaction with K uptake have been most studied. A mutant-based study (Wu L. B. et *al.*, 2019) showed that K uptake through the K channel AKT1 restricts excess Fe uptake and mitigates excess Fe-induced leaf bronzing, and a genome-wide association study (Matthus et *al.*, 2015) has also linked AKT1 to genotypic differences in shoot Fe concentration. Evidently K uptake reinforces Fe exclusion mechanisms. However, the interactions of Fe toxicity with other nutrients, such as Mg and Ca, have been less intensively investigated, and genes that potentially mediate the effect of these elements remain to be elucidated.

A recent meta-analysis showed that sub-optimal tissue Mg concentrations are particularly common in rice at Fe toxic sites (Kirk et al., 2022). Highly weathered soils in humid tropical regions are generally depleted in Mg due to high rates of leaching (Sun et al., 2013) and little Mg is added in fertilizers. Root-induced changes in the rhizosphere under Fe toxicity, particularly Fe oxidation and resulting acidification, will tend to decrease Mg solubility and hence its availability for plant uptake (Kirk et al., 2022). Deficiency of Mg tends to increase the levels of toxic reactive oxygen species (ROS) (Hauer-Jákli & Tränkner, 2019) typically generated under Fe toxicity (L. B. Wu et al., 2017a). Links between Mg status and Fe toxicity response have also been inferred by transcriptome analysis (Kobayashi N. I. et al., 2018). This showed Mg deficiency upregulated excess Fe-inducible OsFER2, which encodes a Fe storage protein, and downregulated Fe sufficiency-suppressive OsMIR and OsIRO2, which encode a mitochondrial protein regulating Fe homeostasis and a key transcriptional activator regulating Fe deficiency responses, respectively (Aung et al., 2018; Ishimaru et al., 2009; Ogo et al., 2007; Stein et al., 2009). These pieces of evidence suggest that some key components of the Fe toxicity tolerance response may be inactivated at sub-optimal leaf Mg content. However, our knowledge regarding the effect of Mg supply on the Fe toxicity response and the molecular mechanisms involved remains very incomplete.

Our objectives were to characterize the effects of supplying Mg and K on Fe toxicity responses in a diverse set of genotypes at a strongly Fe-toxic field site in the Central Highlands of Madagascar.

# 2. Materials and methods

# 2.1. Experimental setup

A field experiment was conducted with seven rice genotypes differing in their tolerance mechanism to Fe toxicity (Table 6; (Rajonandraina et *al.*, 2023a). Plants were grown under irrigated conditions at Sambaina, Manjakandriana district in the Central Highlands of Madagascar (18°53' S, 47°47' E) during the wet season (December to May) in 2020-2021. The site's soil is a Gleysol with clay loam texture, pH (H<sub>2</sub>O) 4.5, pH (KCl) 4.1, organic carbon 62 g kg<sup>-1</sup>, cation exchange capacity 2.4 cmol<sub>c</sub> kg<sup>-1</sup> and total Fe 57 g kg<sup>-1</sup> of which 10 g kg<sup>-1</sup> is easily soluble on soil reduction (Rakotoson et *al.*, 2019).

A split-plot design was implemented with eight fertilizer treatments containing all genotypes and four replications. The following treatments were applied: control (i.e. no fertilizer), Mg, NK, NKMg, NP, NPK, NPMg and NPKMg at transplanting at the following dose as in a previous study carried out in the same field (Rajonandraina et *al.*, 2023a); 50 kg N ha<sup>-1</sup> as urea, 20 kg P ha<sup>-1</sup> as triple superphosphate, 20 kg K ha<sup>-1</sup> as potassium sulphate, and 26 kg Mg ha<sup>-1</sup> as

kieserite. The size of a subplot, which contained one genotype, was 1.6 m<sup>2</sup> (0.8 m × 2 m). Subplots were randomized in each plot, which was further randomized in blocks of replicates. Four subplots were prepared for each genotype and treatment. Seedlings were transplanted at 21-d old with single plant per hill and a spacing of 20 cm × 20 cm between hills.

Full Name	Short name	Origin	Response to iron toxicity
B14339E-KA-28	KA-28	Indonesia	Tolerant, inclusion
Bahia	Bahia	Spain	Tolerant, exclusion
Ciherang	Ciherang	Indonesia	Sensitive, inclusion
IR64	IR64	IRRI	Sensitive, inclusion
NERICA L-43	L-43	AfricaRice	Tolerant, exclusion
Tsipala 421	Tsipala	Madagascar	Tolerant, exclusion
X265	X265	Madagascar	Tolerant, inclusion

Table 6: List of rice genotypes used in the study

# 2.2. Sampling and measurements

Sampling and measurement were done at different stages of plant growth, namely, tillering, booting, flowering and maturity. Leaf symptoms induced by Fe toxicity were visually scored as leaf bronzing score (LBS) across the whole plant canopy of each subplot as a percentage of leaf area affected on a scale from 0 (no symptoms) to 10 (100% of the leaf area affected) according to (L. B. Wu et *al.*, 2014b). LBS was scored for each time point except at the maturity because of difficulties in differentiation with plant senescence. Plants were collected from two randomly selected hills per subplot, and each plant was dissected into youngest leaf (YL), middle leaves (ML), old leaves (OL) and stem/leaf sheath (ST). Flag leaves (FL) and panicles were additionally sampled at the flowering and maturing stage, respectively. The tissues were oven-dried at 60°C for 48 h until the samples were completely dry and weighed. The samples from two plants from a subplot were pooled prior to element analyses and considered as one replicate. For tissue Fe analysis, oven-dried samples were ground to a powder using a mixer mill (Retsch ZM 200, 0.2-mm sieve).

# 2.3. Mineral analysis

Fe concentration in dry tissue was determined as described previously (Hartmann & Asch, 2018). Briefly, Fe was extracted from pulverized dry tissues using 500 mM sodium dithionite solution, followed by colorimetric assay using 2,2'-dipyridyl. The concentration of Fe in the extract was determined by using a standard curve made with serially diluted Fe standard solution. For the measurement of other mineral elements (K, Mg), dry samples were acid-digested as reported previously (Rajonandraina et *al.*, 2023a) and measured by an inductively coupled plasma mass spectrometry (NexION 350, PerkinElmer), using a standard curve made with serially diluted standard solution.

# 2.4. Data analysis

Statistical analyses were performed with the R program (Version 4.2.0; <u>https://www.R-project.org/</u>) with significance level set at P = 0.05. Treatment effects were analyzed with a mixed model ANOVA using the Imer function in the Ime4 package (Bates et *al.*, 2015). When evaluating the effect of treatment on all genotypes, treatment was considered as a fixed effect, while genotype, block (replicate), and the interaction between block and treatment factor were

considered as random effects, whereas growth stage replaced genotype as random effect when evaluating the treatment effect on each genotype across growth stages. To analyze the effect of Mg, samples from NPK and NP treatments were pooled and considered as -Mg sample group, and samples from NPKMg and NPMg treatments were pooled and considered as +Mg sample group. Similarly, samples from NP and NPMg were pooled and considered as -K sample group, and samples from NPK and NPKMg were pooled and considered as +K sample group, and samples from NPK and NPKMg were pooled and considered as +K sample group. Each of NP, NPMg, NPK, and NPKMg treatment contained 4 replicates of 7 genotypes, thus the sample size was 56 for each of -Mg, +Mg, -K and +K treatment.

# 3. Results

#### 3.1. Effects of K and Mg on rice traits

We evaluated the effects of combinatorial application of N, P, K, and Mg on shoot dry weight (SDW), Fe concentration, LBS, and yield. Data for all seven genotypes and four growth stages showed that P treatment had a dominant positive effect on SDW and yield, suggesting that the growth of plants was greatly limited by P availability (Table 7; Appendix 10). Thus, we only considered data from the plots supplied with P in subsequent analyses.

The effects of K and Mg treatments on leaf symptoms were analyzed at different growth stages. The leaf symptoms as assessed by LBS significantly decreased with the application of Mg fertilizer by an average of 18% (Figure 11A). Although the decrease in LBS caused by Mg treatment lessened as the plants grew, the treatment had a consistent suppressive effect on LBS throughout the growth (34 and 6% in tillering and flowering, respectively). However, supply of Mg had no significant effect on SDW in the reproductive stages (i.e. flowering and maturity), resulting in non-significant effect on grain yield (Figures 11B, C; Table 7). The supply of K had a less striking effect on LBS at each growth stage, and the effect throughout the season was not significant (Figure 11D; Table 7). However, K addition significantly increased SDW during the reproductive stage by an average of 17% (Figure 11E) and this effect carried through to grain yield which was also significantly increased (+15%) (Figure 11F; Table 7). These results indicate that increased Mg supply has a beneficial effect on LBS but not on SDW or grain yield, while increased K supply had the opposite effect.

Factor	SDW	Fe concentration <sup>a</sup>	LBS <sup>b</sup>	Yield
Genotype	***	***	***	***
P treatment	***	ns	ns	***
Mg treatment	**	ns	***	ns
K treatment	ns	*	ns	**

Table 7: ANOVA results on the effect of genotype, P, Mg and K on Fe toxicity-related traits

<sup>a</sup> Fe concentration data derive from all examined tissues (i.e. young leaves, middle leaves, old leaves, and stem/leaf sheaths).

<sup>b</sup> LBS data were only obtained from the tillering, booting and flowering stages.

The result of ANOVA is indicated as follows; ns, not significant; ns, P > 0.05; \*, P < 0.05; \*\*, P < 0.01: \*\*\*, P < 0.001.



**Figure 11:** Effects of Mg and K on leaf bronzing, shoot dry weight and grain yield. (A, D) leaf bronzing score; (B, E) shoot DW; (C, F) grain yield for Mg treatment (A-C) and K treatment (D-F). Data are means  $\pm$  standard errors (n = 56). The result of ANOVA is indicated as follows; ns, P > 0.05; \*, P < 0.05; \*\*, P < 0.01; \*\*\*, P < 0.001.

#### 3.2. Mg effect on shoot Fe uptake and Fe concentrations in different tissues

To get insights into the mechanism of Mg-mediated alleviation of leaf bronzing, we analyzed shoot Fe concentration and content at different growth stages. The supply of Mg significantly increased shoot Fe concentration during the vegetative stages, but the opposite effect was observed during reproductive stages (Figure 12A). Consistent with the effect of Mg supply on SDW and Fe concentration, aboveground Fe content (i.e. the product of SDW and Fe concentration) increased in the +Mg treatment during the vegetative and booting stages (on average by 22%), but at the reproductive growth stage the Fe concentrations in different plant parts.

Leaf Fe concentrations increased strongly between vegetative and reproductive stages, but the +Mg treatment consistently reduced foliar Fe accumulation, except for old leaves during the vegetative stages (Figure 12C).

We investigated if the response to Mg differed between rice genotypes depending on whether they were classified as Fe includers or excluders (Rajonandraina et *al.*, 2023a). The analysis revealed that the effect of Mg supply on LBS was genotype-specific and that the +Mg treatment alleviated leaf bronzing in four of the seven genotypes studied, but three includer-type genotypes did not benefit from Mg addition (Figure 13A). Curiously, these 3 includer-type genotypes had substantially reduced Fe concentrations in young leaves (26% decrease on average), whereas the reduction in Fe concentrations of young leaves was less pronounced in excluder genotypes (average decrease below 18%) (Figure 13B). Local rice variety X265, classified as an Fe includer, appears to be an exception, as Mg addition did not lower Fe concentrations in young leaves while significantly decreasing LBS. We analyzed if these changes were due to an increase in tissue Mg concentrations. Mg concentrations in young leaves at the booting stage were not significantly affected by Mg addition in any of the examined genotypes (Appendix 11), raising the possibility that the effect of Mg was likely through altered rhizosphere processes or interaction with other nutrients (Appendix 11), at least at this growth stage.



**Figure 12:** Effects of Mg on shoot Fe concentration and Fe content. (A) Whole shoot Fe concentration, (B) whole shoot Fe content, and (C) Fe concentrations in above-ground tissues; from tillering to maturity. Data are means  $\pm$  standard errors (n = 56). The result of ANOVA is indicated as follows; ns, P > 0.05; \*, P < 0.05; \*\*, P < 0.01; \*\*\*, P < 0.001.



**Figure 13:** Effects of Mg on LBS and young leaves Fe concentrations in different genotypes at different growth stages. (A) leaf bronzing score (LBS) from tillering to flowering stage. (B) Fe concentration in young leaves from tillering to maturity stage. Data are means  $\pm$  standard errors (n = 8). P values indicate the result of ANOVA analyzing the treatment effect throughout the growth stages.

# 4. Discussion

# 4.1. Fe exclusion mechanisms conferred by Mg supply

Plant responses to an imbalance in the availability of a nutrient are dependent on the status of other mineral elements. For instance, the strength of P deficiency responses is affected by the availability of N and Fe (Balzergue et *al.*, 2017; Hu et *al.*, 2019; Ueda et *al.*, 2020). Fe toxicity is observed at tissue Fe concentrations ranging from 300 to 2000 ppm (Dobermann &

Fairhurst, 2000) and this wide range of critical tissue concentrations is likely due to interactions between excess Fe and deficiencies of other nutrients such as P, K, Ca, Zn and Mg. Such deficiencies may be exacerbated by excess Fe-induced changes in the rhizosphere coupled with unfavorable soil properties such as low cation exchange capacity and pH buffer power (Becker & Asch, 2005; Kirk et al., 2022). Increased availability of these elements consistently mitigates symptoms caused by Fe toxicity (Benckiser et al., 1994; Sahrawat, 2004). For instance, an application of dolomite, which is a mixture of Mg and Ca, effectively mitigated Fe toxicity-triggered reductions in growth and yield of rice in an acid Fe toxic soil in Sri Lanka (Suriyagoda et al., 2017). Similarly, the ratio of available Fe to other divalent cations (i.e. Ca, Mg, Mn) were more closely associated with the degree of yield reduction than Fe concentration alone in Fe toxic acid sulphate soils in Thailand (Moore P. A. et al., 1990). These studies would suggest the benefit of increased supply of divalent cations lies in lowering excess Fe uptake, possibly by direct competition, or increasing their supply offsets any negative effects of their deficiency on Fe toxicity responses. Our data suggest that in some genotypes Mg supply helps Fe exclusion mechanisms (Figure 13), which could be explained by multiple factors. Tadano (1975) reported that reduced Mg supply lowered the Fe exclusion capacity of roots and increased the ratio of Fe translocated to shoots in culture solution, suggesting that Mg decreases Fe uptake or excess root-to-shoot translocation or both. Additionally, increased Fe concentration in stems by Mg treatment (Figure 12C) may form another layer of Fe-exclusion mechanism, as suggested previously (Engel et al., 2012). These effects of Mg on Fe uptake, root-to-shoot translocation and retention in stems could be regarded as a general function of Mg under Fe toxicity, as seen by a negative correlation between leaf Fe and Mg concentrations in a pot study using Fe toxic soils (Genon et al., 1994).

#### 4.2. Mg-induced tissue-tolerance mechanisms

Even though Fe exclusion mechanisms are strengthened, some pieces of evidence suggested tissue-tolerance mechanisms conferred by Mg supply. It was suggested that the concentration ratio of Fe to Mg + Ca in flag leaves, rather than the concentration of Fe per se, is a good indicator for leaf bronzing under Fe toxicity (Sylla, 1994). This implies that Ca and Mg may confer at least some tissue tolerance. Our observations indicated attenuated leaf bronzing formation by Mg supply without a concomitant reduction in Fe concentration (X265 in Figure 13). A previous study also showed that Mg deficiency did not have a substantial effect on leaf Fe concentration but did induce genetic responses similar to those observed under Fe toxicity (Kobayashi N. I. et al., 2018). This suggests that Mg supply may also support tissue-based tolerance mechanisms. The hypothesis that increased Mg supply confers tissue tolerance is also supported by genotypic differences in the benefit provided by Mg treatment. Our data show that the includer genotypes benefitted to a lesser extent from Mg fertilization than the excluder genotypes (Figure 13A). This implies that Mg supply may provide tissue tolerance to plants that already possess exclusion mechanisms, i.e., an additive effect. The mechanisms behind Mg's enhanced tissue tolerance are unclear because we didn't observe a significant increase in Mg concentrations in young leaves during the booting stage. It implies that altered rhizospheric chemical processes or secondary effects on the uptake of other nutrients (Appendix 11), rather than an increase in foliar Mg concentrations, could explain this phenomenon, at least at this growth stage.

# 4.3. Beneficial effects of Mg on mineral stresses

Optimal Mg supply is known to counteract several soil-related stresses. For instance, Mg confers tolerance to aluminum (AI) stress in various plant species (Rengel et *al.*, 2015). In rice, Mg alleviates AI stress partly by reducing AI uptake and oxidative stress (Pandey et *al.*, 2013), although the physiological pathways affected by Mg may vary in different plant species (Silva et *al.*, 2001). Mg also confers tolerance of salinity stress in rice (Chen Z. C. et *al.*, 2017). In both cases, Mg uptake, rather than the contact of roots with high Mg concentration, is the key factor, as shown by the attenuated tolerance in mutant lines lacking functional MGT1 which is a plasma membrane-localized major Mg transporter (Chen Z. C. et *al.*, 2012; Chen Z. C. et *al.*, 2017).

# 5. Conclusions and future perspectives

We have shown in field conditions that increasing the supply of Mg to rice roots improves Fe toxicity tolerance via exclusion- and tissue tolerance-based mechanisms. Mg application effectively reduced leaf bronzing symptoms, suggesting its potential as a targeted strategy. However, the response to Mg varied depending on the genotype's Fe tolerance mechanisms behaviour. This highlights the need for further research to explore the underlying mechanisms of Mg's action and identify markers for selecting Mg-responsive genotypes. Additionally, breeding efforts should prioritize developing rice varieties with efficient Fe exclusion mechanisms and enhanced tolerance to Mg-responsive Fe toxicity alleviation strategies. Encouraging, previous studies have shown more than three-fold variation in leaf Mg concentration among diverse rice accessions grown under control conditions (Chen Z. C. & Ma, 2013; Yang M. et *al.*, 2018). This suggests significant scope for improvement of the Mg status in rice plants through a breeding approach, potentially leading to enhanced responsiveness to Mg application for Fe toxicity mitigation.

# Nutrient status affected by iron toxicity of rice genotypes with different tolerance mechanisms under field-grown conditions\*

\* This chapter is adapted from:

Rajonandraina Toavintsoa, Tovohery Rakotoson, Yoshiaki Ueda, Tantely Razafimbelo, Andry Andriamananjara, Matthias Wissuwa, and Guy Kirk. "Integrated analysis of element data and gene expression in multiple Fe-tolerant lines evaluated in Fe-toxic site": *Short paper in Journal of Plant Nutrition and Soil Science?* Under review with the co-author for submission.

#### Résumé étendu

**Contexte :** Le riz, aliment de base pour plus de la moitié de la population mondiale, est confronté à un défi majeur : la toxicité ferreuse. Ce stress généralisé dans les rizières inondées perturbe les processus végétaux et réduit considérablement les rendements, pouvant les affecter de 12 à 100 %. Bien que les variétés de riz présentent des mécanismes de tolérance à la toxicité ferreuse, ces derniers ne suffisent pas à expliquer entièrement leur comportement et leur performance face à ce stress. Cette recherche vise à explorer le lien entre l'état nutritionnel et la tolérance à la toxicité ferreuse perturbe l'absorption d'autres nutriments essentiels tels que le P, K, Ca, Mg, Zn et Mn, ce qui pourrait influencer la capacité du riz à tolérer ce stress.

**Objectif** : L'objectif de cette recherche est d'étudier la relation entre l'état nutritionnel de la plante et la tolérance à la toxicité ferreuse chez différents génotypes de riz. L'hypothèse formulée est que les génotypes de riz qui parviennent à maintenir des niveaux adéquats de nutriments essentiels dans des conditions de toxicité ferreuse présenteront une meilleure tolérance à ce stress abiotique.

**Méthodes :** Une expérimentation en plein champ de deux ans a été menée sur la haute terre centrale de Madagascar. Elle a porté sur six génotypes de riz à tolérance variable à la toxicité ferreuse, puis a été étendue à sept. L'expérimentation a évalué : le rendement en biomasse et en graines des plantes, les concentrations en éléments nutritifs (Fe, P, K, Ca, Mg, Mn, Zn), les ratios de concentration entre ces éléments et celui du fer. Ces différents paramètres ont été étudiés dans différents tissus et stades de développement. Un dispositif expérimental entièrement randomisé avec quatre répétitions a été utilisé. Les plantes ont été cultivées en conditions submergées et échantillonnées au tallage maximal, à la montaison, à la floraison et à la maturité. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide de : une régression lasso pour identifier les relations entre les facteurs, et une ANOVA à modèle mixte pour évaluer l'influence des mécanismes de tolérance

**Résultats** : Différents mécanismes de tolérance à la toxicité ferreuse se traduisent par des profils nutritionnels distincts, dictant la performance et la résilience du riz face à la toxicité. Sous condition de toxicité ferreuse, les variétés à mécanismes d'exclusion (excluders) privilégient les ratios nutriment/fer en limitant l'absorption du fer, tandis que les variétés à

mécanismes d'inclusion (includers) maximisent l'absorption totale des nutriments, y compris le fer, ce qui conduit à des ratios plus faibles. Les deux stratégies garantissent une production de biomasse suffisante pendant le stade végétatif. Cependant, les génotypes includerssensibles, contrairement aux includers-tolérants, souffrent d'une absorption réduite des nutriments non ferreux pendant le stade reproductif. Cette limitation affecte leur résilience et se traduit par une chute du rendement en biomasse et en grain. Bien que les profils nutritionnels des includers-tolérants et des includers-sensibles semblent similaires, les premiers présentent systématiquement une absorption plus élevée de Ca et de Zn, ainsi que des ratios Ca/Fe et Zn/Fe plus élevés. Ces observations suggèrent un rôle potentiel de ces éléments dans les mécanismes de tolérance à la toxicité ferreuse. La corrélation modérée à faible entre les caractéristiques du riz et l'état nutritionnel implique que d'autres facteurs entrent en jeu, en particulier pour la prévision du rendement. Cela souligne la nécessité d'études spécifiques à chaque stade pour démêler l'interaction complexe entre l'absorption des nutriments, les mécanismes de tolérance et les facteurs environnementaux.

**Conclusion :** Deux points essentiels se dégagent de cette recherche pour améliorer la résilience du riz à la toxicité ferreuse : (i) sélection ciblée : Comprendre les mécanismes de tolérance à chaque stade permet d'orienter les programmes de sélection variétale. L'objectif est de promouvoir des ratios nutriment/fer efficaces pendant la croissance végétative et une absorption globale robuste des nutriments pendant les stades reproductifs. (ii) Agriculture intelligente : la mise en œuvre d'une fertilisation ciblée basée sur les mécanismes de tolérance des génotypes et le stade de croissance du riz peut optimiser l'équilibre nutritionnel et le potentiel de rendement. Si cette étude met en lumière le rôle crucial de l'état nutritionnel dans la tolérance à la toxicité du fer, des limites spécifiques appellent à des recherches plus approfondies. La généralisation de ces résultats nécessite des investigations supplémentaires sur divers génotypes et environnements.

# 1. Introduction

Three crops collectively contribute 60% to global food energy intake, with rice (Oryza sativa L.) standing out as the primary source, supplying 27%. In the 2022-2023 rice season, global production reached 503 million tonnes, marking a threefold increase over the past 50 years (Timmer et *al.*, 2015). Nonetheless, an additional 100 million tonnes of rice production is still required to meet the projected food demands of 9.1 billion people by 2050 (Samal et *al.*, 2022). Achieving this target faces challenges from climate change-induced constraints and, more significantly, from the widespread prevalence of abiotic stresses, particularly iron (Fe) toxicity—a prominent nutritional disorder affecting rice production in the wetlands of the humid tropics and sub-tropic (Becker & Asch, 2005).

The Fe toxicity affects about 18% of rice-growing areas (Mahender et *al.*, 2019), mainly in submerged paddy fields where anaerobic conditions reduce Fe3+ to Fe2+, causing its accumulation in the soil solution and subsequent excessive uptake by rice plants. This excess disrupts plant cell processes, leading to visible distinct bronzing foliar symptoms, while also causing oranging or yellowing symptoms in some varieties, or even a combination of both (Howeler, 1973). Beyond these visual symptoms, Fe toxicity influences various plant aspects such as reduced tillering, reduced panicles number, increased spikelet sterility, delayed flowering, and stunted growth (Bierschenk et *al.*, 2020; Chérif et *al.*, 2009), all collectively contributing to productivity losses ranging from 12% to 100%, contingent on severity (Sahrawat, 2004).

To counter Fe toxicity, rice genotypes have developed tolerance mechanisms: (1) Fe exclusion from roots by oxygen release, oxidizing  $Fe^{2+}$  to  $Fe^{3+}$ ; (2) Fe retention in root cell vacuoles and plastids, decreasing translocation to shoots; (3) Fe compartmentalization into old or less-critical tissues, preventing damages to youngest leaves; and (4) reactive oxygen species (ROS) detoxification through antioxidant enzymatic reactions (Aung & Masuda, 2020; Engel et *al.*, 2012; Kirk et *al.*, 2022; Rajonandraina, et *al.*, 2023a). Despite our current understanding, Fe toxicity continues to constrain rice production, with these mechanisms providing partial explanations for rice performance under Fe-toxic conditions.

Despite the literature's consensus on Fe toxicity thresholds (300 mg L-1 in soil solution and 300 mg kg-1 in rice shoots), field realities reveal a broader range: 10 to 1000 mg L-1 in soil solution to 20 to 2500 mg kg-1 in plant tissue (Becker & Asch, 2005; Kirk, 2004). This variability underscores the complexity of Fe toxicity in rice, extending beyond mere Fe concentrations. Depending on these concentrations, Fe toxicity in rice plants can manifest in two primary ways: direct or indirect, with the latter prevailing in lowland rice. Indirect Fe toxicity reduces or inhibits nutrient uptake particularly for phosphorus (P), potassium (K), calcium (Ca), magnesium (Mg), zinc (Zn) and manganese (Mn), leading to a nutrient imbalance in rice plants (Genon et *al.*, 1994; Olaleye et *al.*, 2007; Sahrawat, 2004). However, our understanding of rice genotypes' nutrient status under Fe toxicity is limited. This research investigates whether the ability of rice genotypes to maintain essential nutrient levels under Fe toxicity conditions contributes to their tolerance.

Besides, plant nutrient ratios in tissues emerged as diagnostic tools for identifying mineral nutrient imbalances (Sumner, 1978). Subsequent studies in the literature often highlight nutritional antagonism or synergy between different nutrients, such as N/S, N/P, K/Mg, K/Ca,
and K/Na (Bohra & Doerffling, 1993; Divito et *al.*, 2015; Güsewell, 2004; Xie et *al.*, 2021). Considering these ratios is crucial for a comprehensive understanding of plant nutrition (Malvi, 2011), as well as for understanding the interplay between nutrient status and rice performance. To analyse the nutrient status of rice genotypes with different tolerance mechanisms to Fe toxicity, we conducted a field experiment on strongly Fe-toxic soil in the Central Highlands of Madagascar, with a set of genotypes contrasting with their tolerance mechanisms.

#### 2. Materials and methods

#### 2.1. Experimental site and genotype

A two-year field experiment was conducted at Sambaina, Manjakandriana district in the Central Highlands of Madagascar (18°53' 12.77"S, 47°47'6.79"E), during the wet seasons (from December to May) of 2019-20 and 2020-21. Six lowland rice genotypes were initially used, with a seventh added in the second year (Table 8; Rajonandraina et *al.*, 2023). The site's soil is a Gleysoil with clay loam texture, pH of 4.5 (in H<sub>2</sub>O) and 4.1 (in KCI), organic carbon 62 g kg<sup>-1</sup>, cation exchange capacity 2.4 cmolc kg<sup>-1</sup> and total Fe 57 g kg<sup>-1</sup> of which 10 g kg<sup>-1</sup> is easily soluble on soil reduction (Rakotoson et *al.*, 2019b). Weather data were collected using a Watchdog station (Spectrum Technologies Inc., Plainfield, IL, USA). In Year 1, the average seasonal temperature was 16.6°C, with a range of 10.0-20.1°C; in Year 2, the average temperature was 16.8°C, with a range of 8.7–21.9°C. Cumulative seasonal rainfall was 242 mm in Year 1 and 742 mm in Year 2.

Full name	Short name	Origin	Tolerance mechanisms for iron toxicity
B14339-KA-28	KA-28	Indonesia	Tolerant-includer
Bahia*	Bahia	Spain	Tolerant-excluder
Ciherang	Ciherang	Indonesia	Sensitive-includer
IR64	IR64	IRRI	Sensitive-includer
NERICA-L-43	L-43	AfricaRice	Tolerant-excluder
Tsipala 421	Tsipala	Madagascar	Tolerant-excluder
X265	X265	Madagascar	Tolerant-includer

**Table 8:** Rice genotypes used in the study, their origin, and their tolerance mechanisms based on past research.

\*Seventh genotypes added in Year 2

#### 2.2. Experimental setup

A completely randomised design was implemented with four replications. Subplots for one genotype, each measuring  $2m^2$  (1m x 2m) in Year 1 and 1.6 m<sup>2</sup> in Year 2, were randomized within one block per replicate and separated by bunds. Fertilizer was broadcast and incorporated into blocks at rates of 50 kg ha<sup>-1</sup> nitrogen (N) as urea, 20 kg P ha<sup>-1</sup> as triple superphosphate and 20 kg K ha<sup>-1</sup> as potassium sulphate.

Seeds were sown in a nursery bed adjacent to the experimental plots and grown for 21 days. Before transplanting, the soil was saturated with irrigation water pumped from a nearby river, hand-ploughed to a depth of 20 cm, harrowed and manually leveled. Once soil was prepared,

21-day-old seedlings were transplanted into plots with single plants per hill and a 20 cm spacing both between and within rows. The plot was maintained submerged with at least 10 cm of standing water throughout experiment, and water depth was controlled by either adding to or removing from the standing layer. A few days prior to harvest, the plot was drained to simplify harvesting process. Additionally, the plot was manually weeded twice before booting stage.

#### 2.3. Plant sampling, measurements, and mineral analysis

Sampling was conducted at the following stages: tillering, booting, flowering and maturity. At each stage, plants were collected from two randomly selected hills per plot and separated into tissue components: youngest leaf (YL), middle leaves (ML), old leaves (OL) and stem/leaf sheath (ST). Additionally, flag leaves (FL) were sampled at flowering stage and panicles (PN) at maturity. The sampled tissues were stored in paper bags, then oven-dried at 60°C for 48h and weighed.

Leaf symptoms of Fe toxicity, including yellowing and bronzing, were visually scored as a percentage of the affected leaf area in the whole plant canopy, using a scale from 0 (no symptoms) to 10 (100% of the leaf area affected). Leaf scoring was done for each sampling time, excluding maturity, because of difficulties in differentiation with plant senescence.

Oven-dried samples were ground to a powder (Retsch ZM 200, 0.2-mm sieve), and analyses for Iron, P, K, calcium (Ca), Magnesium (Mg), Manganese (Mn), and Zinc (Zn) were conducted in each tissue. The Fe concentration in dry tissue was determined using the micro-method, as previously described by Hartmann & Asch, (2018). Briefly, Fe was extracted from pulverized dry tissues using 500 mM sodium dithionite solution, followed by a colourimetric assay using 2,2'-dipyridyl. The concentration of Fe in the extract was determined using a standard curve made with serially diluted Fe standard solutions. For the measurement of other mineral elements (P, K, Ca, Mg, Mn, and Zn), dry samples were portions digested in concentrated HNO3 and H2O2 in a microwave digestion system (MARSXpress, CEM Corporation, Mathews, NC, USA). The concentrations in the digests were measured by ICP-MS (PerkinElmer NexION 350, Boston, MA, USA) using a standard curve made with a serially diluted standard solution.

#### 2.4. Data analysis

Whole shoot Fe concentrations were calculated from the sum of the tissue contents divided by the whole shoot DW. Average rates of shoot Fe, P, K, Ca, Mg, Mn, and Zn uptake over the vegetative and reproductive stages were calculated from the change in total shoot contents divided by the time interval. The ratio of nutrient-to-Fe concentrations in different shoot tissues was also calculated at the booting and maturity stages, to assess their potential partitioning and imbalance in shoot tissues during vegetative and reproductive growth.

Statistical analyses were performed with the R program (Version 4.2.0 https://www.R-project.org/). To allow for co-linearity, relations between LYS, LBS, shoot biomass, grain yield (dependent variables), nutrient concentrations, and nutrient ratios were assessed using lasso regression with the caret package (Kuhn, 2008). To explain each phenotype with the least of the other phenotypes, a model was generated using 51 samples out of the 52 total (6 genotypes in Yr 1 and 7 genotypes in Yr 2, both with 4 replicates), and one sample was used

for cross-validation. This process was repeated 52 times to obtain average coefficients and the relative importance of each variable. A mixed model ANOVA was used to analyse the effects of tolerance mechanisms effects, using the 'Imer' function within the 'Ime4' package (Bates et *al.*, 2015). Tolerance mechanisms were considered as fixed effects, with year as a crossed random effect and genotypes as a nested random effect. Subsequently, Tukey's HSD (Honestly Significant Differences) test was implemented to compare the mean values of each tolerance mechanism.

#### 3. Results

## 3.1. Differences in rice traits associated with iron toxicity tolerance mechanisms at different growth stages

Table 9 highlights the differences in rice traits associated with Fe toxicity tolerance mechanisms across vegetative and reproductive stages. Sensitive-includer consistently had lower LYS values, while both tolerant-includer and tolerant-excluder scores are consistently higher across stages. There are no statistically significant differences in LYS between the two tolerant genotypes at the booting stage, though tolerant-excluder slightly outscores at flowering. Contrastingly, when comparing LBS to LYS, the opposite pattern was observed, with sensitive-includer consistently having the highest LBS, while both tolerant-includer and tolerant-excluder score lower throughout the stages. During the booting stages, tolerant-excluder scored slightly but significantly lower than tolerant-includer, yet this trend was reversed during flowering.

**Table 9:** Differences in rice traits respond to Fe toxicity tolerance mechanisms at vegetative and reproductive stages. Values for "Includer" and "Excluder" are means of 16 and 20 replicates, respectively. Similar letters in a column indicate no significant difference by HSD-test. LYS= leaf yellowing score (0-10 scale), LBS= leaf bronzing score (0-10 scale), SDW= shoot dry weight.

Mechanisms	LYS		LBS		SDW (g plant⁻¹)		Yield (g m⁻²)
	Booting	Flowering	Booting	Flowering	Booting	Flowering	Maturity
Sensitive-includer	2.9 <sup>b</sup>	3.3°	6.6 <sup>a</sup>	8 <sup>a</sup>	14.1 <sup>a</sup>	14.9 <sup>b</sup>	207°
Tolerant-includer	4.1 <sup>a</sup>	4.6 <sup>b</sup>	3.7 <sup>b</sup>	5.2°	14.6 <sup>a</sup>	20.2 <sup>a</sup>	416 <sup>a</sup>
Tolerant-excluder	3.6 <sup>ab</sup>	4.7 <sup>a</sup>	3.5°	5.4 <sup>b</sup>	15.6 <sup>a</sup>	20.5 <sup>a</sup>	352 <sup>b</sup>

For SDW, while no significant differences between tolerance mechanisms were observed during booting stages, during flowering, both tolerant-excluder and tolerant-includer had 27 % higher SDW compared to sensitive-includer, which had the lowest. Differences that partially maintained in grain yield, with tolerant-includer yielding the highest, sensitive-includer yielding the lowest, and tolerant-excluder falling in between with a moderate yield.

#### 3.2. Nutritional status during vegetative growth

During vegetative growth (from transplanting to booting), nutrient uptake rates differed between tolerance mechanisms (Figure 14A), with statistical significance observed for the uptake rates of P, Ca, Fe, Mn, and Zn, but not for K and Mg. Both tolerant genotypes show contrasting patterns of nutrient uptake rates, with tolerant-excluder having lower rates, while

tolerant-includer consistently has the highest rates. In contrast, both includer mechanisms show similar patterns of nutrient uptake rates, differing only in Ca, Mn, and Zn uptake rates, with tolerant-includer having higher rates for these elements.

In Figure 14B, a significant difference in nutrient concentration among tolerance mechanisms was observed at the booting stage, with its pattern partially mirroring the observed nutrient uptake rates during vegetative growth. Tolerant-includer genotypes have higher nutrient concentrations, while tolerant-excluder genotypes consistently have the lowest. However, both includer mechanisms maintained similar nutrient concentrations, except higher Ca but lower Mg and Fe concentrations in tolerant-includer compared to sensitive-includer genotypes.

At the booting stage, a significant difference in nutrient-to-Fe concentration ratios was observed (Figure 14C). Interestingly, despite its lower nutrient uptake rates and concentrations, tolerant-excluder consistently maintains the highest nutrient ratio. In contrast, includer mechanisms, characterised by their higher nutrient uptake rates and concentrations, consistently have the lowest overall nutrient ratio, with values ranging from 43-48% lower, had depending on the specific element. Although both tolerant and sensitive-includer genotypes lower nutrient ratios, they differed exclusively in their Ca/Fe and Zn/Fe concentration ratios, with tolerant-includer having higher values compared to sensitive-includer.



**Figure 14:** Plant nutritional status at vegetative stage: (A) nutrient uptake rate, (B) nutrient concentration, (C) nutrient/Fe concentration ratio. A is from transplanting to booting; B and C are at booting stage. Common letters indicate no significant difference by Tukey's HSD test.



#### 3.3. Nutritional status during reproductive growth

**Figure 15:** Plant nutritional status at reproductive stage: (A) nutrient uptake rate, (B) nutrient concentration, and (C) nutrient/Fe concentration ratio. A is from booting to maturity; B and C are at flowering stage. Common letters indicate no significant difference by Tukey's HSD test.

Throughout the reproductive growth stage (from booting to maturity), Figure 15A highlights significant differences in nutrient uptake rates among tolerance mechanisms. Sensitive-includer genotypes consistently have the lowest uptake rates, averaging 63% to 87% lower than both tolerant genotypes. In contrast, tolerant-includer and tolerant-excluder genotypes consistently have the highest uptake rates for all studied nutrients. During reproductive growth, tolerant-includer and tolerant-excluder genotypes either maintain or enhance nutrient uptake rates compared to the preceding vegetative growth, while sensitive-includer genotypes show a decrease in uptake rate for all nutrients except Fe, which continues to increase.

At the flowering stage (Fig 15B), nutrient concentrations varied among tolerance mechanisms, showing significant differences for P, Ca, Mg, Mn, and Fe, but none for K and Zn. Despite having a lower uptake rate, sensitive-includer genotypes show higher concentrations, particularly for P, Mg, Fe, and Mn. In contrast, both tolerant genotypes have a lower nutrient concentration, except for higher Ca and Mn concentrations in tolerant-includers. There were no significant changes in nutrient concentrations from vegetative to reproductive growth, except for Fe and P. Regardless of genotype, P concentrations increased from booting to flowering, while Fe concentrations increased in tolerant-excluder genotypes but decreased in both includers.

At the flowering stage (Fig. 15C), nutrient-to-Fe concentration ratios differed between tolerance mechanisms, with significant differences for Ca/Fe, Mn/Fe, and Zn/Fe, but none for P/Fe, K/Fe, Mg/Fe. In contrast to its pattern at the booting stage, tolerant-excluder genotypes now have nutrient ratios that are either similar to or lower than those of tolerant-includer. While differences between tolerant-includer and sensitive-includer persisted until the flowering stage, with tolerant-includer having higher Ca/Fe, Zn/Fe, and, additionally, Mn/Fe ratios compared to sensitive-includer and tolerant-includer.

#### 3.4. Relationship between Fe and other nutrients throughout the growth stage

Pearson's correlation analysis in Figure 16 explored Fe relationships with other mineral concentrations throughout the growth stage in response to Fe toxicity. At the booting stage (Fig. 16A), Ca-Fe was the only mineral pair with a consistent positive correlation for each mechanism/genotype. In contrast, P-Fe had a negative correlation specific to sensitive-includers. Tolerant-excluder genotypes showed positive correlations between all nutrients and Fe, except for P, whereas tolerant-includer genotypes had limited correlations to K-Fe, Ca-Fe, Mg-Fe, and between Ca-Fe, and Zn-Fe pairs in sensitive-includers.

Transitioning to the flowering stage, the correlation between Fe and other mineral concentrations is less pronounced than in the preceding booting stage (Fig. 16B). The consistent negative correlation between P-Fe and additionally, K-Fe remains specific to sensitive-includers, with no observed positive correlation during the flowering stage. However, few positive correlations persist until the flowering stage for tolerant excluder (Ca-Fe, Mn-Fe, and Zn-Fe) and tolerant-includer genotypes (Mg-Fe).



**Figure 16:** Analysis of correlations between Fe and other nutrient concentrations (A) at booting stage and (B) at flowering stage. The 'r' denotes Pearson's correlation coefficients. Significance levels are indicated as follows: 'ns' for non-significant (p > 0.05); \* for p < 0.05; \*\* for p < 0.01; and \*\*\* for p < 0.001.

#### 3.5. Variable explaining LYS, LBS, shoot biomass, and grain yield

Table 10 presents the outcomes from lasso regression, which assesses how single nutrient concentrations and nutrient ratios affect LYS, LBS, shoot biomass, and yield. It is noteworthy that the model's explanatory power for LYS, LBS, shoot biomass, and yield based on nutrient status falls within the range of weak to moderate, as evidenced by R-square values respectively of 0.41, 0.52, 0.37, and 0.55 and 0.37, for yield prediction at booting and flowering stages.

**Table 10:** Relations between leaf yellowing score (LYS), leaf bronzing score (LBS), shoot biomass, and yield to nutrients concentrations using lasso regression. The variables were adjusted to a common scale, so the relative magnitudes of the coefficients indicate the relative importance of the variables. Positive values indicate the phenotype positively influences the trait, and vice versa.

Variables	LYS <sup>ac</sup>	LBS <sup>ac</sup>	SUMpc	Grain yield <sup>b</sup>		
Variables			3011	Booting	Flowering	
P concentration	0.22	1.42			28.74	
K concentration				-79.47	-20.02	
Ca concentration		-1.88				
Mg concentration	-1.09	-1.05			-77.18	
Mn concentration						
Zn concentration			5.90	62.87		
Fe concentration	-0.16	0.95				
P/Fe	0.14	-3.69				
K/Fe						
Ca/Fe			13.31	91.44		
Mg/Fe		2.50	-6.43	-150.85		
Mn/Fe						
Zn/Fe		-1.14	-9.14	-95.86		
(Ca+Mg)/Fe		1.64		-174.19		
(K+Ca+Mg+Mn+Zn)/Fe						
RMSE	1.27	1.38	6.69	88.31	103.86	
Rsquare	0.41	0.52	0.37	0.55	0.37	

<sup>a</sup>predicted from young leaf (YL+ML) nutrient concentration (calculated by summing the leaves' tissue contents and dividing by the leaves DW).

<sup>b</sup> predicted from whole shoot nutrient concentration

<sup>c</sup> We used preceding stage nutritional statuses, to predict phenotypes at the booting, flowering, and maturity stages, combining the data to make an overall prediction.

Specifically, LYS exhibits a robust and negative association with Mg concentrations, highlighted by the highest absolute coefficients at -1.09. In contrast, LBS is primarily influenced by the P/Fe ratio, presenting substantial negative influence with a coefficient of -3.69. For shoot biomass, Ca/Fe have the highest absolute coefficient of 13.31, positively influencing it. Examining yield, (Ca+Mg)/Fe and Ca/Fe ratios emerge as the main predictor during the booting stage, contrasting with Mg concentrations at flowering stage, all negatively influencing yield with respective coefficients of -174, -150 and -77. It's noteworthy that yield prediction at the booting stage is mainly explained by nutrient-Fe ratios, but inversely explained by nutrient

concentrations at flowering stage. Furthermore, yield prediction at the booting stage shows greater robustness compared to the flowering stage.

#### 4. Discussions

## 4.1. Nutritional status in vegetative stage: Unveiling the trade-offs of exclusion and inclusion mechanisms

Our study unveils distinct nutrient statuses in rice genotypes during vegetative growth, driven by their mechanisms to tolerate Fe toxicity. Tolerant-excluders have lower nutrient uptake rates and concentrations of Fe, P, Ca, Mn, and Zn, yet strategically maintain the highest overall nutrients-to-Fe ratios. In contrast, includer genotypes, whether tolerant or sensitive, show higher nutrient uptake rates and concentrations, including Fe, resulting in lower nutrientto-Fe ratios.

One possible mechanism that could explain how tolerant-excluders maintain this balance is through the active modification of root physiology, particularly through oxidative processes leading to the formation of a Fe plaque. This plaque effectively restricts Fe influx, thereby reducing Fe uptake while hindering the uptake of the other essential nutrients. This aligns with prior studies demonstrating the substantial reductions in Fe, P, Ca, Mn, and Zn uptake due to the heavy coating of Fe plaque in rice roots (Zhang et *al.*, 1999; Pereira et *al.*, 2014). Despite seemingly lower nutrient uptake, this strategy is crucial for excluders to maintain optimal nutrient balances for essential metabolic processes, including the exclusion mechanisms themselves. Studies have demonstrated that P, K, Ca, Mg, Mn deficiency can impair rice roots' Fe exclusion ability, thereby affecting plant's tolerance to Fe toxicity (Sahrawat, 2009).

In contrast, includers genotypes adopt a different strategy by maximizing nutrient uptake. However, this approach comes at a cost – increased Fe exposure and potentially lower overall tolerance to Fe toxicity. Interestingly, no significant differences in biomass were observed among both mechanisms at the vegetative stage (Table 9). This implies that the trade-offs exhibited by both excluder and includer genotypes are effective in maintaining good biomass at the vegetative stage. However, the full consequences of these trade-offs may not become apparent until the reproductive stage, where heightened nutrient demands and the crucial need to tolerate Fe toxicity become more critical.

#### 4.2. Nutrient status in reproductive stage

The nutrient dynamics during the reproductive stage reveal intriguing variations between genotypes, in response to Fe toxicity. Both tolerant-includer and tolerant-excluder genotypes were able to maintain or enhance nutrient uptake rates during reproductive growth, while sensitive-includer genotypes exhibited a decline in nutrient uptake for all nutrients except for Fe, which paradoxically increased in shoots (Figure 15B). This differential response suggests that tolerant genotypes have evolved distinct mechanisms which was efficient overall growth to cope with Fe toxicity, ensuring the maintenance of optimal nutrient availability for optimal growth and productivity.

Tolerant-excluders successfully possibly maintain nutrient uptake rate by either reducing Fe uptake through Fe exclusion or minimizing the Fe excess effect through tissue compartmentalization during reproductive growth (Rajonandraina et *al.*, 2023a). Conversely, tolerant-includer genotypes allowed Fe uptake, yet effectively mitigated the risk of Fe-induced

oxidative stress through compartmentalization in older tissues and tissue tolerance, as elucidated by previous research (Rajonandraina et *al.*, 2023a). In contrast to their tolerant counterparts, sensitive-includer genotypes exhibited a decline in nutrient uptake for non-Fe nutrients, coupled with a paradoxical increase in Fe accumulation in shoots. This counterintuitive rise suggests an inherent inability to effectively regulate Fe uptake and translocation, leading to Fe toxicity and compromising nutrient acquisition for essential processes.

Intriguingly, despite lower nutrient uptake rates, sensitive-includer genotypes displayed higher nutrient concentrations compared to both tolerant genotypes. This seeming paradox can be explained by the dilution effect, wherein lower biomass results in a higher concentration of nutrients in rice shoots, while inversely higher biomass of tolerant genotypes results in lower nutrient concentrations.

The observation that tolerant genotypes exhibit higher biomass compared to sensitive-includer genotypes during reproductive growth underscores their superior nutrient acquisition and utilization strategies, likely contributing to improved tolerance to Fe toxicity and higher yields. Conversely, the poor shoot biomass of sensitive-includers may compromise overall productivity and resilience to Fe stress. While higher nutrient concentrations may seem beneficial, they may be counterproductive if they cannot support adequate growth and reproduction. This intricate interplay of nutrient dynamics and biomass underscores the complexity of plant responses to Fe toxicity during the reproductive stage, emphasizing the need for further exploration and understanding of these mechanisms for informed crop management.

#### 4.3. Potential roles of Ca and Zn in tolerant-includer genotypes

Throughout the stages of rice growth, tolerant-includers consistently exhibited higher Ca and Zn uptake rates, along with elevated Ca/Fe and Zn/Fe ratios compared to sensitive-includers. This suggests a potential link between these nutrients and Fe tolerance for tolerant-includer genotypes. Possible mechanisms explaining this association include Zn's effective competition with  $Fe^{2+}$  for the transporter protein (OsIRT1), and the chelator nicotinamine (NA). This competition disrupts Fe influx and Fe-NA complex formation, hindering phloem loading, and ultimately limiting Fe uptake, translocation and shoot accumulation (Wu et *al.*, 2022).

Excess Fe in plants results in thylakoid membrane disintegration, a decrease in chloroplast number per cell, reduced chlorophyll contents, and inhibition of net photosynthesis (Terry & Low, 1982). In contrast, Zn has the potential to enhance plant photosynthetic efficiency by improving the photochemistry of photosystem II (PS II) by increasing the fraction of energy utilized for the photochemistry of PS II and restoring the PS II redox state (Wu et *al.*, 2022). Additionally, an increase in chlorophyll contents was observed with elevated Ca<sup>2+</sup> levels in rice plants. Through exchange adsorption or by mass transpiration stream, Ca<sup>2+</sup> reaches chloroplast (Kirkby & Pilbeam, 1984). As a result, Ca<sup>2+</sup> in leaves reduces chlorophyll loss and protein degradation in plants (Poovaiah & Leopold, 1973).

Furthermore, Zn can modulate ROS production, thereby mitigating the oxidative stress induced by excess Fe (Marreiro et *al.*, 2017). In addition, Ca enhances antioxidant defence mechanisms by activating antioxidant enzymes like ascorbate (AsA), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), monodehydroascorbate reductase (MDHAR), and dehydroascorbate

reductase (DHAR) reducing ROS production (Rahman et *al.*, 2015). This protective action helps safeguard chloroplasts from damage and preserve photosynthetic efficiency (Kirkby & Pilbeam, 1984).

The lower Fe concentration observed in shoots of tolerant-includers during both vegetative and reproductive stages (Figures.14B and 15B), coupled with the reduced leaf bronzing symptoms, strongly supports the notion of Ca and Zn-mediated regulation. This emphasizes their potential role in Fe tolerance in tolerant-includer genotypes.

# 4.4. From leaf symptoms to yield: a complex interplay of nutrient status and Fe toxicity

Our study reveals how plant nutrient status influences leaf symptoms in conditions of Fe toxicity. A negative association between LYS and Mg concentrations has been observed, suggesting that adequate Mg levels are crucial for preventing LYS symptoms. This is consistent with previous research (Howeler, 1973) showing that leaf oranging symptoms are associated with a deficiency in essential nutrients including Mg, as well as others like P, K, and Ca, induced by indirect Fe toxicity. Further strengthening the significance of nutrient balance, our study shows a negative association between LBS and P/Fe ratio. Maintaining an optimal P/Fe ratio is crucial to minimize leaf bronzing. Elevated Fe levels disrupt the critical process of P uptake, affecting photosynthesis, energy transfer, and overall plant health, leading to stunted growth and increased vulnerability to Fe stress, including leaf bronzing. It is noteworthy that our findings while aligning with the importance of nutrient balance, present a partial contradiction to prior research (Rajonandraina, Ueda, et *al.*, 2023b) suggesting that Mg supplementation reduces LBS. Our data indicate that Mg does indeed reduce LBS, albeit to a lesser extent than its influence on LYS.

Shoot biomass correlated positively with Ca/Fe ratio, indicating growth synergy. However, yield prediction at booting stage had a contrasting negative association with both (Ca+Mg)/Fe and Ca/Fe ratios. This divergence underscores the context-dependent influence of nutrient ratios on plant traits, supported by earlier research suggesting minimal impact near optimal values (Sumner, 1978). The negative correlation between yield and nutrient-to-Fe ratios during booting suggests a potential trade-off in resource allocation. Elevated levels of Ca and Mg, while beneficial for shoot biomass may, disrupt vital processes during reproductive stage.

Our finding also highlights the stage-specific influence on nutrient status, with yield prediction showing greater robustness at the booting stage and a primary dependence on nutrient-to-Fe ratios. This suggests that focusing on these ratios during early growth stages could be an effective strategy for optimizing yield potential. However, further research is needed to validate this concept across multiple genotypes and environmental conditions.

#### 5. Conclusion

Different Fe tolerance mechanisms result in distinct nutrient patterns, dictating rice performance and resilience under Fe toxicity.

1. Under Fe stress, excluders prioritize nutrient-to-Fe ratios by restricting Fe uptake, while includers maximize overall nutrient uptake, including Fe, leading to lower ratios. Both strategies guarantee sufficient biomass production during vegetative growth.

2. Unlike tolerant genotypes, sensitive-includers suffer reduced non-Fe nutrient uptake during reproductive growth, compromising resilience and plummeting biomass and yield.

3. While the nutrient patterns of tolerant-includers and sensitive-includers appear similar, the former consistently exhibit higher Ca and Zn uptake, along with elevated Ca/Fe and Zn/Fe ratios, hinting at their potential roles in Fe tolerance mechanisms

4. The moderate to weak correlation between rice traits and nutrient status implies additional factors in play, particularly during yield prediction, highlighting the need for stage-specific investigations to unravel the complex interplay between, nutrient uptake, tolerance mechanisms and environmental factors.

This research offers two major takeaways for enhancing rice resilience to Fe toxicity: (i) Target breeding: by understanding stage-specific tolerance mechanisms, we can tailor breeding programs. For example, promoting efficient nutrient-to-iron ratios during vegetative growth and robust overall nutrient uptake during reproductive stages. (ii) Smart farming: implementing targeted fertilization based on genotype mechanisms and growth stage can optimize nutrient balance and yield potential. While this study sheds light on the essential role of nutrient status in Fe toxicity tolerance, specific limitations call for further investigation. The generalizability of these findings requires further research across diverse genotypes and environments. Additionally, the precise roles of Ca and Zn in tolerance mechanisms warrant detailed elucidation.

# Discussion générale, conclusion, et perspectives de recherche future

Le fer pose un défi aux plants de riz, car il agit à la fois comme nutriment essentiel à la croissance et comme élément potentiellement toxique en excès. Maintenir cet équilibre est crucial pour garantir une performance optimale du riz, en particulier dans les environnements riches en fer. Cette étude met en lumière plusieurs aspects de la réponse du riz à la toxicité ferreuse, tels que résumés dans la Figure 17. Elle a permis de déchiffrer les mécanismes de tolérance spécifiques à chaque stade de développement du riz tout au long de son cycle. Il est important de noter que cette recherche a également exploré le rôle important de la supplémentation en Mg dans l'atténuation du brunissement foliaire induit par la toxicité ferreuse chez le riz. De plus, cette étude souligne l'interaction entre les stratégies d'absorption des nutriments dépendant du génotype et leurs effets combinés sur la tolérance contre la toxicité ferreuse.

#### 1. Mécanismes polyfactoriels de tolérance contre la toxicité ferreuse

Pendant le stade végétatif, caractérisée par une croissance rapide et des besoins nutritionnels plus élevés, le riz doté de mécanismes d'exclusion peut maintenir un apport en nutriments plus équilibré en limitant l'absorption du fer. Ces mécanismes fonctionnent comme une première ligne de défense, minimisant l'absorption du fer et empêchant une inhibition potentielle de la croissance due à une surcharge en fer, facteur finalement essentiel pour un bon rendement (Chapitre 2). Cette priorisation est évidente chez les génotypes possédant un mécanisme à exclusion, qui maintiennent activement un ratio nutriment/fer élevé, garantissant ainsi des ressources suffisantes pour la production de biomasse (Chapitre 4). Il est intéressant de noter que le Mg joue un rôle de soutien dans ce processus, renforçant l'efficacité de l'exclusion (Chapitre 3). Dans l'ensemble, la compréhension de ce mécanisme contribue au développement de stratégies visant à améliorer la tolérance du riz aux environnements riches et toxiques en fer.

Bien que le mécanisme à exclusion soit crucial, son efficacité diminue pendant le stade reproductif, entraînant une accumulation accrue de fer dans les parties aériennes. Pour faire face à ce changement, les génotypes de riz dotés de mécanismes à inclusion adoptent des stratégies supplémentaires, comme discuté au chapitre 2. Ces mécanismes comprennent la compartimentation du fer et la tolérance tissulaire, qui permettent une croissance soutenue, même sous des niveaux élevés de fer pendant le stade reproductif. De plus, les inclusions tolérantes maintiennent une absorption accrue des nutriments pendant cette phase, préservant le potentiel de rendement malgré des niveaux de fer comparables aux inclusions sensibles (Chapitre 4). En outre, le Mg contribue à la tolérance tissulaire, bien que le mécanisme exact reste flou (Chapitre 3). Il est intéressant de noter que les inclusions tolérantes ont également montré une absorption accrue de Ca et de Zn, ce qui pourrait jouer un rôle dans leur tolérance accrue au fer (Chapitre 4). Cette analyse complète souligne la nature multidimensionnelle de la régulation du fer chez les plants de riz. Elle met également en évidence le rôle potentiel d'éléments supplémentaires tels que le Mg, le Ca et le Zn dans l'absorption du fer et au-delà.

		Tol	Sensible		
		Excluder	Includer	Includer	
		Bahia, L-43, Tsipala	KA-28, X265	IR64, Ciherang	
Stade végétatif	Mécanismes de tolérance	• Exclusion (favorisée par l'apport en Mg)	<ul> <li>Tolérance tissulaire (favorisée par l'apport en Mg)</li> <li>Compartmentation du Fer</li> </ul>		
	Statut nutritionnel	<ul> <li>Faible taux d'absorption des nutriments</li> <li>Faible concentration en nutriments</li> <li>Ratio nutriments/Fer élevé</li> </ul>	<ul> <li>Taux d'absorption des nutriments élevé</li> <li>Concentration en nutriments élevé</li> <li>Faible ratio nutriments/Fer</li> </ul>		
7	Phénotypes	<ul> <li>LBS faible (réduite par l'apport en Mg)</li> <li>Biomasse élevée</li> </ul>	<ul> <li>LBS modéré (réduite par l'apport en Mg)</li> <li>Biomasse élevée</li> </ul>	<ul> <li>LBS élevé (réduite par l'apport en Mg)</li> <li>Biomasse élevée/ modérée</li> </ul>	
Stade reproductif	Mécanismes de tolérance	<ul> <li>Tolérance tissulaire (favorisée par l'appor</li> <li>Compartmentation du Fer</li> </ul>			
	Statut nutritionnel	<ul> <li>Taux d'absorption des nutriments élevé</li> <li>Faible concentration en nutriments</li> </ul>	<ul> <li>Taux d'absorption des nutriments élevé</li> <li>Faible concentration en nutriments</li> <li>Ratio Ca/Fe, Mn/Fe, Zn/Fe élevé</li> </ul>	<ul> <li>Faible taux d'absorption des nutriments</li> <li>Concentration en nutriments élevé</li> <li>Faible ratio nutriments/Fer</li> </ul>	
	Phénotypes	<ul> <li>LBS élevé (réduite par l'apport en Mg)</li> <li>Biomasse élevée/ modérée</li> </ul>	<ul> <li>LBS élevé (réduite par l'apport en Mg)</li> <li>Biomasse faible</li> </ul>		
	Productivité	Rendeme	nt élevé en grains	Faible rendement en grains	

Figure 17: Modèle conceptuel des résultats clés à travers les chapitres

#### 2. Stratégies de tolérance du riz contre la toxicité ferreuse dépendant du stade de développement

La compréhension de la capacité du riz à résister à la toxicité ferreuse repose principalement sur ses réponses spécifiques à chaque stade de développement. Pendant la phase végétative, l'accent est mis sur la promotion d'une croissance saine. Les mécanismes d'exclusion minimisent activement l'absorption du fer afin d'atténuer le risque de retard de croissance. La compartimentation et la tolérance tissulaire agissent comme des mesures complémentaires et offrent une protection supplémentaire. Cependant, l'affaiblissement des mécanismes d'exclusion pendant le stade reproductif entraîne une accumulation accrue de fer. Durant cette phase, la compartimentation et la tolérance tissulaire deviennent cruciales pour les génotypes tolérants, leur permettant de prospérer même en présence de niveaux élevés de fer (Chapitre 2).

Ajoutant une couche supplémentaire de complexité, différents génotypes de riz présentaient des stratégies d'absorption des nutriments distinctes à différents stades. Les variétés à mécanisme exclusion privilégient le maintien de ratios nutriment/fer élevés en régulant strictement l'absorption du fer pendant le stade végétatif, tandis que les variétés à mécanisme inclusions, qu'elles soient tolérantes ou sensibles, se concentrent sur la maximisation de l'acquisition globale des nutriments, y compris le fer, ce qui se traduit par des ratios plus faibles. Cet écart devient particulièrement critique pendant le stade reproductif, où les inclusions sensibles affichent une absorption réduite des nutriments autres que le fer, compromettant leur résilience et entraînant des rendements plus faibles. À l'inverse, les inclusions tolérantes maintiennent ou même augmentent l'absorption globale des nutriments, garantissant ainsi une production efficace de biomasse et de rendement malgré des niveaux de fer similaires aux inclusions sensibles (Chapitre 4).

#### 3. Symptômes foliaires : Au-delà d'un simple indicateur

Si le brunissement foliaire est un symptôme bien connu de la toxicité ferreuse chez le riz, cette étude révèle ses limites en tant qu'indicateur unique à la fois de la tolérance et du potentiel de rendement. Différents génotypes de riz présentent des sensibilités variables au brunissement, même lorsque leur rendement en grains n'est pas affecté (Chapitre 2). De plus, les inclusions tolérantes peuvent toujours présenter du brunissement, bien qu'elles mettent en œuvre des mécanismes tels que la compartimentation et la tolérance tissulaire. Ce constat souligne la nécessité d'aller au-delà du simple recours aux symptômes visuels pour évaluer la tolérance.

De plus, cette étude (Chapitre 3) a mis en évidence le rôle de soutien du Mg dans l'atténuation du brunissement foliaire, bien que les mécanismes exacts restent flous. Cela suggère que le Mg pourrait contribuer à atténuer l'expression visuelle de la toxicité ferreuse, même lorsque les mécanismes de tolérance sous-jacents ne peuvent pas empêcher totalement le brunissement.

#### 4. Point fort et limites de l'étude

Ce travail apporte des éclairages précieux sur la réponse du riz à la toxicité ferreuse en s'appuyant sur plusieurs points forts. La conduite de l'étude en conditions de plein champ permet une meilleure compréhension réaliste du comportement du riz en situation réelle, en

tenant compte des facteurs environnementaux naturels absents des milieux contrôlés. De plus, l'inclusion de divers génotypes de riz et leur évaluation à différents stades de croissance autorisent une analyse exhaustive des mécanismes de tolérance au fer et de leur variabilité au sein des populations rizicoles. En outre, cette étude a intégré la supplémentation en Mg, mettant en lumière ses bénéfices potentiels dans l'atténuation de la toxicité ferreuse et suggérant des stratégies alternatives de gestion en dehors des approches traditionnelles de sélection variétale.

Cependant, cette étude comporte certaines limitations. Si la recherche démontre l'efficacité du Mg dans la réduction du brunissement foliaire, les mécanismes exacts de son action restent flous. Des investigations supplémentaires sont nécessaires pour comprendre pleinement son rôle dans la tolérance contre la toxicité ferreuse. De plus, l'étude s'est principalement concentrée sur le Mg, laissant la place à l'exploration d'autres amendements nutritionnels ou pratiques culturales potentiels qui pourraient concentrée sur la partie aérienne de la plante, négligeant l'allocation racinaire du fer qui n'a pas été étudiée, bien qu'elle joue un rôle important dans la tolérance à la toxicité ferreuse. Une exploration détaillée de ces mécanismes pourrait fournir des informations précieuses pour le développement de nouvelles stratégies de gestion de la toxicité ferreuse.

#### 5. Perspectives de recherche future

Ces domaines clés méritent d'être explorés plus en profondeur afin d'affiner notre compréhension et de développer des stratégies efficaces pour lutter contre la toxicité ferreuse et améliorer la résilience du riz dans les environnements riches en fer.

Développement de protocoles de criblage spécifiques aux stades de développement : Les méthodes de criblage actuelles négligent la nature dynamique des mécanismes de tolérance tout au long du cycle de croissance. Par conséquent, le développement de protocoles de criblage spécifiques à chaque stade est crucial pour évaluer de manière exhaustive les différents mécanismes de tolérance aux stades végétatif et reproductif. Cela permettra aux chercheurs d'identifier des germoplasmes supérieurs dotés de mécanismes de tolérance améliorés, et d'approfondir ainsi la compréhension de l'interaction entre ces différents mécanismes et leur contribution à la tolérance globale. En conséquence, les stratégies de sélection variétale pourront être affinées en sélectionnant des génotypes présentant une tolérance robuste aux différents stades de croissance.

**Décrypter le rôle du Mg et d'autres modulateurs potentiels :** Si cette étude souligne l'intérêt du Mg pour atténuer les symptômes de la toxicité ferreuse, des recherches supplémentaires sont nécessaires pour en éclairer les mécanismes sous-jacents. Cela implique d'explorer les voies physiologiques et moléculaires associées à la tolérance induite par le Mg, telles que les voies de transduction du signal et les profils d'expression génique. En s'appuyant sur les observations initiales concernant le Ca et le Zn, des investigations plus approfondies sont nécessaires pour déterminer leurs rôles spécifiques dans l'amélioration de la tolérance. Cela pourrait passer par des études comparatives de génotypes tolérants et sensibles afin de comprendre les différences d'absorption et d'utilisation de ces éléments sous stress de toxicité ferreuse. De plus, l'évaluation des effets combinés de la supplémentation en

ces nutriments avec le Mg sur la tolérance au fer et le rendement du riz pourrait fournir des informations précieuses.

**Exploration des interactions avec les facteurs environnementaux :** La toxicité ferreuse chez le riz interagit souvent avec divers facteurs environnementaux, affectant la sévérité et l'efficacité des différents mécanismes de tolérance. Pour acquérir une compréhension plus complète de la toxicité ferreuse chez le riz, les recherches futures devraient examiner ces interactions. Un domaine d'exploration est le rôle du microbiome du sol dans la modulation des mécanismes d'absorption et de tolérance contre la toxicité ferreuse. Cela implique l'analyse de la composition du microbiome des sols riches en fer et l'examen des interactions entre des communautés microbiennes spécifiques et les systèmes racinaires du riz. La compréhension de ces dynamiques peut fournir des informations précieuses sur la manière dont l'activité microbienne influence la toxicité ferreuse et la tolérance du riz, contribuant ainsi à des stratégies de gestion plus efficaces dans la pratique agricole.

Amélioration des programmes de sélection variétale : Les résultats de cette étude peuvent contribuer à affiner les programmes de sélection visant à développer des variétés de riz plus tolérantes à la toxicité ferreuse. Une approche consiste à identifier les marqueurs associés aux mécanismes de tolérance. Grâce aux informations tirées des protocoles de criblage spécifiques aux stades de développement et aux études sur le Mg et d'autres modulateurs potentiels, il est possible d'identifier des marqueurs génétiques liés à des mécanismes de tolérance spécifiques. Cela permet de sélectionner des caractères souhaitables dans les programmes de sélection, facilitant ainsi le développement de variétés de riz présentant des caractéristiques de tolérance ciblées. La sélection pour une tolérance à large spectre est essentielle. Cela implique le développement de variétés de riz dotées de mécanismes de tolérance robustes et efficaces à différents stades de croissance et dans des conditions environnementales variables. En sélectionnant pour une tolérance à large spectre, les variétés de riz pourront faire preuve de résilience à la toxicité ferreuse dans divers contextes agricoles.

**Optimisation des pratiques agricoles :** Les connaissances acquises grâce à cette recherche ont le potentiel d'impacter significativement le développement et l'amélioration des pratiques agricoles visant à augmenter la production de riz dans les environnements riches en fer. En optimisant les stratégies de fertilisation sur la base de la compréhension des besoins nutritionnels spécifiques à chaque stade de développement et en tenant compte des avantages potentiels de la supplémentation en Mg et d'autres éléments bénéfiques, les agriculteurs peuvent mieux soutenir la croissance et le développement du riz sur les sols riches en fer. De plus, l'exploration du potentiel des amendements du sol est prometteuse pour améliorer la production de riz. L'étude de l'efficacité d'amendements tels que la matière organique ou des minéraux spécifiques pour modifier les propriétés du sol et réduire la disponibilité du fer pourrait fournir des informations précieuses sur les approches durables pour atténuer la toxicité ferreuse et améliorer la santé des sols.

En conclusion, cette étude apporte une contribution précieuse à notre compréhension de la relation complexe entre les mécanismes de tolérance à la toxicité ferreuse, les stratégies d'absorption des nutriments et le rendement du riz en conditions de plein champ. Ces résultats soulignent le rôle crucial de la spécificité du stade de développement et des variations de l'absorption des nutriments en fonction du génotype. Ils offrent des connaissances précieuses pour le développement de programmes de sélection variétale et de pratiques agricoles visant

à améliorer la tolérance à la toxicité ferreuse chez le riz, contribuant ainsi au final à l'augmentation de la productivité rizicole et à une meilleure gestion des cultures dans les environnements riches en fer. En exploitant ces connaissances, les chercheurs et les praticiens du secteur agricole peuvent travailler ensemble pour assurer la sécurité alimentaire dans les régions confrontées à la toxicité ferreuse et contribuer au développement de variétés de riz plus résilientes.

### **Références bibliographiques**

- Annisa W., and Nursyamsi D. (2017). Iron dynamics and its relation to soil redox potential and plant growth in acid sulphate soil of south kalimantan, Indonesia. Indonesian Journal of Agricultural Science, 17(1), 1-8.
- Aoyama T., Kobayashi T., Takahashi M., Nagasaka S., Usuda K., Kakei Y., Ishimaru Y., Nakanishi H., Mori S., and Nishizawa N. K. (2009). OsYSL18 is a rice iron(III)deoxymugineic acid transporter specifically expressed in reproductive organs and phloem of lamina joints. Plant Molecular Biology, 70(6), 681–692.
- Armstrong W. (1980). Aeration in higher plants. Advances in Botanical Research, 7, 226–332.
- Arouna A., Fatognon I. A., Saito K., and Futakuchi K. (2021). Moving toward rice selfsufficiency in sub-Saharan Africa by 2030: Lessons learned from 10 years of the Coalition for African Rice Development. World Development Perspectives, 21.
- Asch F., Dahal K. P., and Das U. S. (2003). Is the transpiration history of rice leaves indicative for the salt load of individual leaves. University of Göttingen and ATSAF: Technological and Institutional Innovations for Sustainable Rural Development. Klartext GmbH, Göttingen, 124.
- Asch F., Dingkuhn M., Dörffling K., and Miezan K. (2000). Leaf K/Na ratio predicts salinity induced yield loss in irrigated rice. Euphytica, 113, 109-118.
- Audebert A., and Fofana M. (2009). Rice yield gap due to iron toxicity in West Africa. Journal of Agronomy and Crop Science, 195(1), 66–76.
- Audebert A., and Sahrawat K. L. (2000). Mechanisms for iron toxicity tolerance in lowland rice. Journal of Plant Nutrition, 23(11–12), 1877–1885.
- Aung M. S., and Masuda H. (2020). How Does Rice Defend Against Excess Iron? Physiological and Molecular Mechanisms. Frontiers in Plant Science, 11, 1–8.
- Aung M. S., Masuda H., Kobayashi T., and Nishizawa N. K. (2018). Physiological and transcriptomic analysis of responses to different levels of iron excess stress in various rice tissues. Soil Science and Plant Nutrition, 64(3), 370–385.
- Balzergue C., Dartevelle T., Godon C., Laugier E., Meisrimler C., Teulon J. M., Creff A., Bissler M., Brouchoud C., Hagège A., Müller J., Chiarenza S., Javot H., Becuwe-Linka N., David P., Péret B., Delannoy E., Thibaud M. C., Armengaud J., and Desnos T. (2017). Low phosphate activates STOP1-ALMT1 to rapidly inhibit root cell elongation. Nature Communications, 8(1).
- Bashir K., Ishimaru Y., and Nishizawa N. K. (2010). Iron uptake and loading into rice grains. Rice, 3, 122–130.
- Bashir K., Ishimaru Y., Shimo H., Kakei Y., Senoura T., Takahashi R., Sato Y., Sato Y., Uozumi N., Nakanishi H., and Nishizawa N. K. (2011). Rice phenolics efflux transporter 2 (PEZ2) plays an important role in solubilizing apoplasmic iron. Soil Science and Plant Nutrition, 57(6), 803–812.

- Bates D., Mächler M., Bolker B. M., and Walker S. C. (2015). Fitting linear mixed-effects models using Ime4. Journal of Statistical Software, 67(1).
- Becker M., and Asch F. (2005). Iron toxicity in rice Conditions and management concepts. Journal of Plant Nutrition and Soil Science, 168(4), 558–573.
- Becker M., Ngo N. S., and Schenk M. K. A. (2020). Silicon reduces the iron uptake in rice and induces iron homeostasis related genes. Scientific Reports, 10(1).
- Begg C. B. M., Kirk G. J. D., Mackenzia A. F., and Neue H. U. (1994). Root-induced iron oxidation and pH changes in the lowland rice rhizosphere. New Phytologist, 128(3), 469–477.
- Benckiser G., Santiago S., Neue H. U., and Ottow, J. C. G. (1994). Effect of fertilization on exudation, dehydrogenase activity, iron-reducing populations and Fe ++ formation in the rhizosphere of rice (Oryza sativa L.) in relation to iron toxicity. Plant and soil, 79, 305-316.
- Bhindhu P. S., Sureshkumar P., Abraham M., and Kurien E. K. (2018). Effect of liming on soil properties, nutrient content, and yield of wetland rice in acid tropical soils of Kerala. International Journal of Bio-Resource and Stress Management, 9(4), 541–546.
- Bierschenk B., Tagele M. T., Ali B., Ashrafuzzaman M. D., Wu L. B., Becker M., and Frei, M. (2020). Evaluation of rice wild relatives as a source of traits for adaptation to iron toxicity and enhanced grain quality. PLoS ONE, 15(1), 1–17.
- Bohra J. S., and Doerffling K. (1993). Potassium nutrition of rice (Oryza sativa L.) varieties under NaCl salinity. Plant and Soil, 152(2), 299–303.
- Briat J. F., Curie C., and Gaymard F. (2007). Iron utilization and metabolism in plants. Current Opinion in Plant Biology, 10(3), 276–282.
- Briat J. F., Duc C., Ravet K., and Gaymard F. (2010a). Ferritins and iron storage in plants. Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects, 1800(8), 806–814.
- Briat J. F., Ravet K., Arnaud N., Duc C., Boucherez J., Touraine B., Cellier F., and Gaymard F. (2010b). New insights into ferritin synthesis and function highlight a link between iron homeostasis and oxidative stress in plants. Annals of Botany, 105(5), 811–822.
- Broderick J. B. (2004). Iron-Sulfur clusters in enzyme catalysis. Comprehensive Coordination Chemistry II, 8, 739–757.
- Cakmak I. (1988). Morphologische und physiologische Veraenderungen bei Zinkmangelpflanzen.
- Che J., Yamaji N., and Ma J. F. (2021). Role of a vacuolar iron transporter OsVIT2 in the distribution of iron to rice grains. New Phytologist, 230(3), 1049–1062.
- Chen Z. C., Yamaji N., Motoyama R., Nagamura Y., and Ma J. F. (2012). Up-Regulation of a magnesium transporter gene OsMGT1 is required for conferring aluminum tolerance in rice. Plant Physiology, 159(4), 1624-1633.
- Chen C. C., Dixon J. B., and Turner F. T. (1980). Iron coatings on rice roots: mineralogy and quantity influencing factors. Soil Science Society of America Journal, 44(3), 635–639.

- Chen Z. C., and Ma J. F. (2013). Magnesium transporters and their role in Al tolerance in plants. Plant and Soil, 368(1–2), 51–56.
- Chen Z. C., Yamaji N., Horie T., Che J., Li J., An G., and Ma J. F. (2017). A magnesium transporter OsMGT1 plays a critical role in salt tolerance in rice. Plant Physiology, 174(3), 1837–1849.
- Chérif M., Audebert A., Fofana M., and Zouzou M. (2009). Evaluation of iron toxicity on lowland irrigated rice in West Africa. Tropicultura, 27(2), 88–92.
- Coskun D., Deshmukh R., Sonah H., Menzies J. G., Reynolds O., Ma J. F., Kronzucker H. J., and Bélanger R. R. (2019). The controversies of silicon's role in plant biology. New Phytologist, 221(1), 67–85.
- Debona D., Rodrigues F. A., and Datnoff L. E. (2017). Silicon's role in abiotic and biotic plant stresses. Annual Review Phytopathol, 55, 85-107.
- Dingkuhn M., Radanielina T., Raboin L. M., Dusserre J., Ramantsoanirina A., Sow A., Manneh B., Balde A. B., Soulié J. C., Shrestha S., Ahmadi N., and Courtois B. (2015). Field phenomics for response of a rice diversity panel to ten environments in Senegal and Madagascar. 2. Chilling-induced spikelet sterility. Field Crops Research, 183, 282–293.
- Diop B., Wang D. R., Drame K. N., Gracen V., Tongoona P., Dzidzienyo D., Nartey E., Greenberg A. J., Djiba S., Danquah E. Y., and McCouch S. R. (2020). Bridging old and new: Diversity and evaluation of high iron-associated stress response of rice cultivated in West Africa. Journal of Experimental Botany, 71(14), 4188–4200.
- Divito G. A., Echeverría H. E., Andrade F. H., and Sadras V. O. (2015). Diagnosis of S deficiency in soybean crops: Performance of S and N: S determinations in leaf, shoot and seed. Field Crops Research, 180, 167–175.
- Dobermann A., and Fairhurst T. (2000). Nutrient Disorders & Nutrient Management. International Rice Research Institute.
- Dossou-Yovo E. R., Kouadio S. A. K., and Saito K. (2023). Effects of mid-season drainage on iron toxicity, rice yield, and water productivity in irrigated systems in the derived savannah agroecological zone of West Africa. Field Crops Research, 296.
- Dufey I., Draye X., Lutts S., Lorieux M., Martinez C., and Bertin P. (2015a). Novel QTLs in an interspecific backcross Oryza sativa × Oryza glaberrima for resistance to iron toxicity in rice. Euphytica, 204(3), 609-625.
- Dufey I., Gheysens S., Ingabire A., Lutts S., and Bertin P. (2014). Silicon application in cultivated rices (Oryza sativa L and Oryza glaberrima Steud) alleviates iron toxicity symptoms through the reduction in iron concentration in the leaf tissue. Journal of Agronomy and Crop Science, 200(2), 132-142.
- Dufey I., Hakizimana P., Draye X., Lutts S., and Bertin P. (2009). QTL mapping for biomass and physiological parameters linked to resistance mechanisms to ferrous iron toxicity in rice. Euphytica, 167(2), 143–160.

- Dufey I., Mathieu A. S., Draye X., Lutts S., and Bertin P. (2015b). Construction of an integrated map through comparative studies allows the identification of candidate regions for resistance to ferrous iron toxicity in rice. Euphytica, 203(1), 59–69.
- Dumanović J., Nepovimova E., Natić M., Kuča K., and Jaćević V. (2021). The Significance of reactive oxygen species and antioxidant defense system in plants: A concise overview. Frontiers in Plant Science, 11.
- Eide D., Broderius M., Fett J., and Guerinot M. Lou. (1996). A novel iron-regulated metal transporter from plants identified by functional expression in yeast. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 93(11), 5624–5628.
- Engel K., Asch F., and Becker M. (2012). Classification of rice genotypes based on their mechanisms of adaptation to iron toxicity. Journal of Plant Nutrition and Soil Science, 175(6), 871–881.
- Fageria N. K., Carvalho G. D., Santos A. B., Ferreira E. P. B., and Knupp A. M. (2011). Chemistry of lowland rice soils and nutrient availability. Communications in Soil Science and Plant Analysis, 42(16), 1913–1933.
- Fageria N. K., Santos A. B., Barbosa Filho M. P., and Guimarães C. M. (2008). Iron toxicity in lowland rice. Journal of Plant Nutrition, 31(9), 1676–1697.
- FAO. (2017). Rice market monitor 21. www.Fao.Org/Economic/Est/Publications/Rice-Publications/Rice-Market-Monitor-Rmm/.
- Finatto T., de Oliveira A. C., Chaparro C., da Maia L. C., Farias D. R., Woyann L. G., Mistura C. C., Soares-Bresolin A. P., Llauro C., Panaud O., and Picault N. (2015). Abiotic stress and genome dynamics: specific genes and transposable elements response to iron excess in rice. Rice, 8(1), 1-18.
- Finazzi G., Petroutsos D., Tomizioli M., Flori S., Sautron E., Villanova V., Rolland N., and Seigneurin-Berny D. (2015). Ions channels/transporters and chloroplast regulation. Cell Calcium, 58(1), 86–97.
- Foyer C. H., and Shigeoka S. (2011). Understanding oxidative stress and antioxidant functions to enhance photosynthesis. Plant Physiology, 155(1), 93–100.
- Fu Y. Q., Yang X. J., and Shen H. (2014). The physiological mechanism of enhanced oxidizing capacity of rice (Oryza sativa L.) roots induced by phosphorus deficiency. Acta Physiologiae Plantarum, 36(1), 179–190.
- Gao P. P., Zheng G. H., Wu Y. H., and Liu P. (2014). Effect of exogenous potassium on photosynthesis and antioxidant enzymes of rice under iron toxicity. Russian Journal of Plant Physiology, 61(1), 47-52.
- Genon J. G., De Hepcee N., Duffy J. E., Delvaux B., and Hennebert P. A. (1994). Iron toxicity and other chemical soil constraints to rice in highland swamps of Burundi. Plant and Soil, 166, 109-115.
- Gross J., Stein R. J., Fett-Neto A. G., and Fett J. P. (2003). Iron homeostasis related genes in rice. Genetics and Molecular Biology, 26, 477-497.

- Güsewell, S. (2004). N:P ratios in terrestrial plants: Variation and functional significance. New Phytologist, 164(2), 243–266.
- Han T., Cai A., Liu K., Huang J., Wang B., Li D., Qaswar M., Feng G., and Zhang H. (2019). The links between potassium availability and soil exchangeable calcium, magnesium, and aluminum are mediated by lime in acidic soil. Journal of Soils and Sediments, 19(3), 1382–1392.
- Hartmann J., and Asch F. (2018). Micro-method to determine iron concentrations in plant tissues using 2,2' bipyridine. Journal of Plant Nutrition and Soil Science, 181(3), 357–363.
- Hauer-Jákli M., and Tränkner M. (2019). Critical leaf magnesium thresholds and the impact of magnesium on plant growth and photo-oxidative defense: A systematic review and metaanalysis from 70 years of research. Frontiers in Plant Science, 10.
- Hinrichs M., Fleck A. T., Biedermann E., Ngo N. S., Schreiber L., and Schenk M. K. (2017). An ABC transporter is involved in the silicon-induced formation of casparian bands in the exodermis of rice. Frontiers in Plant Science, 8.
- Howeler R. H. (1973). Iron-Induced oranging disease of rice in relation to physico-chemical changes in a flooded oxisol. Soil Science Society of America Journal, 37(6), 898–903.
- Hu B., Jiang Z., Wang W., Qiu Y., Zhang Z., Liu Y., Li A., Gao X., Liu L., Qian Y., Huang X., Yu F., Kang S., Wang Y., Xie J., Cao S., Zhang L., Wang Y., Xie Q., and Chu C. (2019). Nitrate–NRT1.1B–SPX4 cascade integrates nitrogen and phosphorus signalling networks in plants. Nature Plants, 5(4), 401–413.
- Inoue H., Kobayashi T., Nozoye T., Takahashi M., Kakei Y., Suzuki K., Nakazono M., Nakanishi H., Mori S., and 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(6), 3470–3479.
- Inoue H., Mizuno D., Takahashi M., Nakanishi H., Mori S., and Nishizawa N. K. (2004). A Rice FRD3-Like (OsFRDL1) Gene Is Expressed in the Cells Involved in Long-Distance Transport. Soil Science and Plant Nutrition, 50(7), 1133-1140.
- Ishimaru Y., Bashir K., Fujimoto M., An G., Itai R. N., Tsutsumi N., Nakanishi H., and Nishizawa N. K. (2009). Rice-specific mitochondrial iron-regulated gene (MIR) plays an important role in iron homeostasis. Molecular Plant, 2(5), 1059–1066.
- Jianguo H., and Shuman L. M. (1991). Phosphorus status and utilization in the rhizosphere of rice. Soil Science, 152(5), 360-364.
- Kakei Y., Ishimaru Y., Kobayashi T., Yamakawa T., Nakanishi H., and Nishizawa N. K. (2012). OsYSL16 plays a role in the allocation of iron. Plant Molecular Biology, 79(6), 583–594.
- Kawase M. (1981). Anatomical and morphological adaptation of plants to waterlogging. HortScience, 16(1), 30-34.
- Kehrer J. P. (2000). The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. Toxicology, 149(1), 43-50.
- Kirk G. J. D. (2004). The biogeochemistry of submerged soils. Wiley & Sons.

- Kirk G. J. D., Boghi A., Affholder M. C., Keyes S. D., Heppell J., and Roose T. (2019). Soil carbon dioxide venting through rice roots. Plant Cell and Environment, 42(12), 3197–3207.
- Kirk G. J. D., and Du L. Van. (1997). Changes in rice root architecture, porosity, and oxygen and proton release under phosphorus deficiency. New Phytologist, 135(2), 191-200.
- Kirk G. J. D., Manwaring H. R., Ueda Y., Semwal V. K., and Wissuwa M. (2022). Below-ground plant–soil interactions affecting adaptations of rice to iron toxicity. Plant Cell and Environment, 45(3), 705–718.
- Kirkby E. A., and Pilbeam D. J. (1984). Calcium as a plant nutrient. Plant, Cell & Environment, 7(6), 397–405.
- Kobayashi N. I., Ogura T., Takagi K., Sugita R., Suzuki H., Iwata R., Nakanishi T. M., and Tanoi K. (2018). Magnesium deficiency damages the youngest mature leaf in rice through tissue-specific iron toxicity. Plant and Soil, 428(1–2), 137–152.
- Kobayashi T., and Nishizawa N. K. (2012). Iron uptake, translocation, and regulation in higher plants. Annual Review of Plant Biology, 63, 131–152.
- Koike S., Inoue H., Mizuno D., Takahashi M., Nakanishi H., Mori S., and Nishizawa N. K. (2004). OsYSL2 is a rice metal-nicotianamine transporter that is regulated by iron and expressed in the phloem. Plant Journal, 39(3), 415–424.
- Kuhn M. (2008). Building Predictive Models in R Using the caret Package. Journal of Statistical Software, 28, 1-26
- Li B., Sun L., Huang J., Göschl C., Shi W., Chory J., and Busch W. (2019). GSNOR provides plant tolerance to iron toxicity via preventing iron-dependent nitrosative and oxidative cytotoxicity. Nature Communications, 10(1).
- Li G., Kronzucker H. J., and Shi W. (2016). Root developmental adaptation to Fe toxicity: Mechanisms and management. Plant Signaling and Behavior, 11(1).
- Li H., Yang X., and Luo A. (2001). Ameliorating effect of potassium on iron toxicity in hybrid rice. Journal of Plant Nutrition, 24(12), 1849–1860.
- Liu J., Leng X., Wang M., Zhu Z., and Dai Q. (2011). Iron plaque formation on roots of different rice cultivars and the relation with lead uptake. Ecotoxicology and Environmental Safety, 74(5), 1304–1309.
- Lucena J. J. (2000). Effects of bicarbonate, nitrate and other environmental factors on iron deficiency chlorosis. A review. Journal of Plant Nutrition, 23(11–12), 1591–1606.
- Ma J. F., and Takahashi E. (2002). Soil, fertilizer and plant silicon research in japan. Elsevier.
- Mahender A., Swamy B. P. M., Anandan A., and Ali J. (2019). Tolerance of iron-deficient and -toxic soil conditions in rice. Plants, 8(2), 31.
- Malvi U. R. (2011). Interaction of micronutrients with major nutrients with special reference to potassium. Karnataka Journal Agricultural Sciences, 24(1), 106–109.
- Marreiro D. D. N., Cruz K. J. C., Morais J. B. S., Beserra J. B., Severo J. S., and De Oliveira A. R. S. (2017). Zinc and oxidative stress: current mechanisms. Antioxidants, 6(2), 24.

- Matthus E., Wu L. B., Ueda Y., Höller S., Becker M., and Frei M. (2015). Loci, genes, and mechanisms associated with tolerance to ferrous iron toxicity in rice (Oryza sativa L.). Theoretical and Applied Genetics, 128(10), 2085–2098.
- Melandri G., Sikirou M., Arbelaez J. D., Shittu A., Semwal V. K., Konaté K. A., Maji A. T., Ngaujah S. A., Akintayo I., Govindaraj V., Shi Y., Agosto-Peréz F. J., Greenberg A. J., Atlin G., Ramaiah V., and McCouch S. R. (2021). Multiple small-effect alleles of indica origin enhance high iron-associated stress tolerance in rice under field conditions in West Africa. Frontiers in Plant Science, 11.
- Meng L., Wang B., Zhao X., Ponce K., Qian Q., and Ye G. (2017). Association mapping of ferrous, zinc, and aluminum tolerance at the seedling stage in Indica rice using MAGIC populations. Frontiers in Plant Science, 8.
- Mengel K., and Kosegarten H. (2000). Iron transport through plant membranes. Jahrestagung Der Deutschen Gesellschaft Für Pflanzenernährung, 3(5).
- Miller G. W., Denney A., Pushnik J., and Yu M. H. (1982). The Formation of deltaaminolevulinate a precursor of chlorophyll, in barley and the role of iron. Journal of Plant Nutrition, 5(4–7), 289–300.
- Mittler R. (2017). ROS Are Good. Trends in Plant Science, 22(1), 11–19.
- Mkhonza N. P., Buthelezi-Dube N. N., and Muchaonyerwa P. (2020). Effects of lime application on nitrogen and phosphorus availability in humic soils. Scientific Reports, 10(1), 1–12.
- Montás Ramírez L., Claassen N., Ubiera A. A., Werner H., and Moawad A. M. (2002). Effect of phosphorus, potassium and zinc fertilizers on iron toxicity in wetland rice (Oryza sativa L.). Plant and Soil, 239(2), 197–206.
- Moore K. L., Chen Y., van de Meene A. M. L., Hughes L., Liu W., Geraki T., Mosselmans F., Mcgrath S. P., Grovenor C., and Zhao F. J. (2014). Combined NanoSIMS and synchrotron X-ray fluorescence reveal distinct cellular and subcellular distribution patterns of trace elements in rice tissues. New Phytologist, 201(1), 104–115.
- Moore P. A., Attanandana T., and Patrick W. H. (1990). Factors affecting rice growth on acid sulfate soils. Soil Science Society of America Journal, 54, 1651–1656.
- Mori S. (1998). Iron transport in graminaceous plants. Metal lons in Biological Systems, 35, 215–238.
- Morrissey J., and Guerinot M. Lou. (2009). Iron uptake and transport in plants: The good, the bad, and the ionome. Chemical Reviews, 109(10), 4553–4567.
- Nikolic M., and Römheld V. (2001). The role of the leaf apoplast in iron nutrition of plants. Plant Nutrition: Food Security and Sustainability of Agro-Ecosystems through Basic and Applied Research, 274–275.
- Ning X., Lin M., Huang G., Mao J., Gao Z., and Wang X. (2023). Research progress on iron absorption, transport, and molecular regulation strategy in plants. Frontiers in Plant Science, 14, 1–11.

- Nozoye T., Nagasaka S., Kobayashi T., Takahashi M., Sato Y., Sato Y., Uozumi N., Nakanishi H., and Nishizawa N. K. (2011). Phytosiderophore efflux transporters are crucial for iron acquisition in graminaceous plants. Journal of Biological Chemistry, 286(7), 5446–5454.
- Nugraha Y., Utami D. W., Rosdianti I., Ardie S. W., Ghulammahdi M., Suwarno S., and Aswidinnoor H. (2016). Markers-traits association for iron toxicity tolerance in selected Indonesian rice varieties. Biodiversitas, 17(2), 753–763.
- Ogo Y., Nakanishi Itai R., Nakanishi H., Kobayashi T., Takahashi M., Mori S., and Nishizawa N. K. (2007). The rice bHLH protein OsIRO2 is an essential regulator of the genes involved in Fe uptake under Fe-deficient conditions. The Plant Journal, 51(3), 366–377.
- Olaleye A. O., Tabi F. O., Ogunkunle A. O., Singh B. N., and Sahrawat K. L. (2007). Effect of toxic iron concentrations on the growth of lowlands rice. Journal of Plant Nutrition, 24(3), 441-457
- Pandey P., Srivastava R. K., and Dubey R. S. (2013). Salicylic acid alleviates aluminum toxicity in rice seedlings better than magnesium and calcium by reducing aluminum uptake, suppressing oxidative damage and increasing antioxidative defense. Ecotoxicology, 22(4), 656–670.
- Parveen S., Ranjan R. K., Anand A., and Singh B. (2018). Combined deficiency of nitrogen and iron increases senescence induced remobilization of plant immobile iron in wheat. Acta Physiologiae Plantarum, 40(12), 1–12.
- Patrick W. H. (1981). The role of inorganic redox systems in controlling reduction in paddy soils. Proceedings of Symposium on Paddy Soils, 107–117. Springer Berlin Heidelberg.
- Patrick W. H., Mikkelsen D. S., and Wells B. R. (1985). Plant Nutrient Behavior in Flooded Soil. Fertilizer technology and use, 6, 197-228.
- Peng C., Chen S., Shen C., He M., Zhang Y., Ye J., Liu J., and Shi J. (2018). Iron plaque: a barrier layer to the uptake and translocation of copper oxide nanoparticles by rice plants. Environmental Science and Technology, 52(21), 12244–12254.
- Peng X. X., and Yamauchi M. (1993). Ethylene production in rice bronzing leaves induced by ferrous iron. Plant and Soil, 149, 227-234.
- Pereira E. G., Oliva M. A., Rosado-Souza L., Mendes G. C., Colares D. S., Stopato C. H., and Almeida A. M. (2013). Iron excess affects rice photosynthesis through stomatal and nonstomatal limitations. Plant Science, 201–202(1), 81–92.
- Pereira E. G., Oliva M. A., Siqueira-Silva A. I., Rosado-souza L., Pinheiro D. T., Almeida A. M., Inacio A., Rosado-souza L., and Pinheiro D. T. (2014). Tropical rice cultivars from lowland and upland cropping systems differ in iron plaque formation. Journal of Plant Nutrition, 37(9), 1373–1394.
- Peyron M., Bertora C., Pelissetti S., Said-Pullicino D., Celi L., Miniotti E., Romani M., and Sacco D. (2016). Greenhouse gas emissions as affected by different water management practices in temperate rice paddies. Agriculture, Ecosystems and Environment, 232, 17–28.

- Ponnamperuma F. N. (1972). The Chemistry of Submerged Soils. Advances in Agronomy, 24, 29–96.
- Poovaiah B. W., and Leopold A. C. (1973). Deferral of Leaf Senescence with Calcium. Plant Physiology, 52(3), 236–239.
- Prade K., Ottow J. C. G., Jacq V. A., Malouf G., and Loyer J. Y. (1990). Relations entre les propriétés des sols de rizières inondées et la toxicité ferreuse en basse Casamance ( Sénégal ). Orstom, XXV, 453–474.
- Prasetyo T. B., Ahmad F., and Saidi A. (2019). Humic acid and water management to decrease Ferro (Fe2+) solution and increase productivity of established new rice field. Journal of tropical soils, 17(1), 9–17.
- Quinet M., Vromman D., Clippe A., Bertin P., Lequeux H., Dufey I., Lutts S., and Lefèvre I. (2012). Combined transcriptomic and physiological approaches reveal strong differences between short- and long-term response of rice (Oryza sativa) to iron toxicity. Plant, Cell and Environment, 35(10), 1837–1859.
- Rahman A., Mostofa M. G., Alam M. M., Nahar K., Hasanuzzaman M., and Fujita M. (2015). Calcium mitigates arsenic toxicity in rice seedlings by reducing arsenic uptake and modulating the antioxidant Defense and Glyoxalase Systems and Stress Markers. BioMed Research International, 2015.
- Rajonandraina T., Rakotoson T., Wissuwa M., Ueda Y., Razafimbelo T., Andriamananjara A., and Kirk G. J. D. (2023a). Mechanisms of genotypic differences in tolerance of iron toxicity in field-grown rice. Field Crops Research, 298.
- Rajonandraina T., Ueda Y., Wissuwa M., Kirk G. J. D., Rakotoson T., Manwaring H., Andriamananjara A., and Razafimbelo T. (2023b). Magnesium supply alleviates iron toxicity-induced leaf bronzing in rice through exclusion and tissue-tolerance mechanisms. Frontiers in Plant Science, 14, 1–15.
- Rakotoson T., Ergezinger L., Rajonandraina T., Razafimbelo T., Wu L. B., and Frei M. (2019). Physiological investigations of management and genotype options for adapting rice production to iron toxicity in Madagascar. Journal of Plant Nutrition and Soil Science, 182(3), 485–495.
- Read A. D., Bentley R. E., Archer S. L., and Dunham-Snary K. J. (2021). Mitochondrial iron– sulfur clusters: Structure, function, and an emerging role in vascular biology: Mitochondrial Fe-S Clusters – a review. Redox Biology, 47.
- Rengel Z., Bose J., Chen Q., and Tripathi B. N. (2015). Magnesium alleviates plant toxicity of aluminium and heavy metals. Crop and Pasture Science, 66(12), 1298–1307.
- Robinson N. J., Procter C. M., Connolly E. L., and Guerinot M. L. (1999). A ferric-chelate reductase for iron uptake from soils. Nature, 397(6721), 694–697.
- Rodenburg J., Zwart S. J., Kiepe P., Narteh L. T., Dogbe W., and Wopereis M. C. S. (2014). Sustainable rice production in African inland valleys: Seizing regional potentials through local approaches. Agricultural Systems, 123, 1–11.

- Römheld V., and Marschner H. (1986). Evidence for a specific uptake system for iron phytosiderophores in roots of grasses. Plant Physiology, 80(1), 175–180.
- Rose T. J., Impa S. M., Rose M. T., Pariasca-Tanaka J., Mori A., Heuer S., Johnson-Beebout S. E., and Wissuwa M. (2013). Enhancing phosphorus and zinc acquisition efficiency in rice: A critical review of root traits and their potential utility in rice breeding. Annals of Botany, 112(2), 331–345.
- Sahrawat K. L. (2004). Iron toxicity in wetland rice and the role of other nutrients. Journal of Plant Nutrition, 27(8), 1471–1504.
- Sahrawat, K. L. (2009). Reducing iron toxicity in lowland rice with tolerant genotypes and plant nutrition. Plant Stress, 4(2), 70–75.
- Saleque M. A., and Kirk G. J. D. (1995). Root-induced solubilization of phosphate in the rhizosphere of lowland rice. New Phytologist, 129(2), 325–336.
- Samal P., Babu S. C., Mondal B., and Mishra S. N. (2022). The global rice agriculture towards 2050: An inter-continental perspective. Outlook on Agriculture, 51(2), 164–172.
- Sarma P., Bharali B. (2015). Effects of Calcium on Physiology of Rice (Oryza sativa L.) under iron toxic condition. Indian Journal of Plant and Soil, 2(2), 47-54.
- Schmidt F., Fortes M. D. Á., Wesz J., Buss G. L., and Sousa, R. O. D. (2013). The impact of water management on iron toxicity in flooded rice. Revista Brasileira de Ciencia Do Solo, 37(5), 1226–1235.
- Schmidt W. (1999). Mechanisms and regulation of reduction-based iron uptake in plants. In New Phytologist, 141(1), 1–26.
- Schuler M., Rellán-Álvarez R., Fink-Straube C., Abadía J., and Bauera P. (2012). Nicotianamine functions in the phloem-based transport of iron to sink organs, in pollen development and pollen tube growth in Arabidopsis. The Plant Cell, 24(6), 2380–2400.
- Seckback J. (1982). Ferreting out the secrets of plant ferritin-a review. Journal of Plant Nutrition, 5(4–7), 369–394.
- Sen Gupta A. S. (1993). Overexpression of superoxide dismutase protects plants from oxidative stress. Plant Physiology., 103, 1067–1073.
- Senoura T., Sakashita E., Kobayashi T., Takahashi M., Aung M. S., Masuda H., Nakanishi H., and Nishizawa N. K. (2017). The iron-chelate transporter OsYSL9 plays a role in iron distribution in developing rice grains. Plant Molecular Biology, 95(4–5), 375–387.
- Shivay Y. S., and Mandi, S. (2020). Advances in understanding iron cycling in soils, uptake/use by plants and ways of optimising iron-use efficiency in crop production. Achieving Sustainable Crop Nutrition, 307–336.
- Sikirou M., Saito K., Achigan-dako E. G., Dramé K. N., Adam A., Venuprasad R., (2015). Genetic improvement of iron toxicity tolerance in rice-progress, challenges and prospects in West Africa. Plant Production Science, 18(4), 423–434.

- Silva I. R., Smyth T. J., Israel D. W., Raper C. D., and Rufty T. W. (2001). Magnesium Ameliorates Aluminum Rhizotoxicity in Soybean by Increasing Citric Acid Production and Exudation by Roots. Plant Cell Physiology, 42(5), 546-554.
- Silveira V. C. D., Oliveira A. P. D., Sperotto R. A., Espindola L. S., Amaral L., Dias J. F., Cunha J. B. D., and Fett J. P. (2007). Influence of iron on mineral status of two rice (Oryza sativa L.) cultivars. Brazilian Journal of Plant Physiology, 19(2), 127–139.
- Smith B. N. (1984). Iron in higher plants: Storage and metabolic role. Journal of Plant Nutrition, 7(1–5), 759–766.
- Stein R. J., Lopes S. I. G., and Fett J. P. (2014). Iron toxicity in field-cultivated rice: Contrasting tolerance mechanisms in distinct cultivars. Theoretical and Experimental Plant Physiology, 26(2), 135–146.
- Stein R. J., Ricachenevsky F. K., and Fett J. P. (2009). Differential regulation of the two rice ferritin genes (OsFER1 and OsFER2). Plant Science, 177(6), 563–569.
- Sumner M. E. (1978). Interpretation of nutrient ratios in plant tissue. Communications in Soil Science and Plant Analysis, 9(4), 335–345.
- Sun X., Kay A. D., Kang H., Small G. E., Liu G., Zhou X., Yin S., & Liu C. (2013). Correlated biogeographic variation of magnesium across trophic levels in a terrestrial food chain. PLoS ONE, 8(11).
- Suriyagoda L. D. B., Sirisena D. N., Somaweera K. A. T. N., Dissanayake A., De Costa W. A. J. M., and Lambers H. (2017). Incorporation of dolomite reduces iron toxicity, enhances growth and yield, and improves phosphorus and potassium nutrition in lowland rice (Oryza sativa L). Plant and Soil, 410(1–2), 299–312.
- Suriyagoda L. D. B., Tränkner M., and Dittert K. (2020). Effects of potassium nutrition and water availability on iron toxicity of rice seedlings. Journal of Plant Nutrition, 43(15), 2350–2367.
- Sylla M. (1994). Soil salinity and acidity: spatial variability and effects on rice production in West Africa's mangrove zone. Wageningen University and Research.
- Tadano T. (1975). Devices of Rice Roots to Tolerate High Iron Concentration in Growth Media. Japan Agriculture Research Quarterly, 9(1), 34–39.
- Tadano T., and Tanaka A. (1970). Studies on the iron nutrition of the rice plant. 3. Iron absorption as affected by the potassium status of the plant. Journal of the Science of Soil and Manure, 41(4), 142–148.
- Terry N., and Low G. (1982). Leaf chlorophyll content and its relation to the intracellular localization of iron. Journal of Plant Nutrition, 5(4–7), 301–310.
- Timmer C. P., Block S. A., and Dawe D. (2015). Long-run dynamics of rice consumption, 1960-2050. Rice in the global economy: strategic research and policy issues for food security, 139-174.
- Tinh T. K. (1999). Reduction chemistry of acid sulphate soils: reduction rates and influence of rice cropping. Acta Universitatis Agriculturae Sueciae, Agraria, 206, 45-pp.

- Trncik C., Detemple F., and Einsle O. (2023). Iron-only Fe-nitrogenase underscores common catalytic principles in biological nitrogen fixation. Nature Catalysis, 6(5), 415–424.
- Tsujimoto Y., Rakotoson T., Tanaka A., and Saito K. (2019). Challenges and opportunities for improving N use efficiency for rice production in sub-Saharan Africa. Plant Production Science, 22(4), 413–427.
- Ueda, Y., Kiba, T., & Yanagisawa, S. (2020). Nitrate-inducible NIGT1 proteins modulate phosphate uptake and starvation signalling via transcriptional regulation of SPX genes. Plant Journal, 102(3), 448–466. https://doi.org/10.1111/tpj.14637
- van Oort P. A. J. (2018). Mapping abiotic stresses for rice in Africa: Drought, cold, iron toxicity, salinity and sodicity. Field Crops Research, 219, 55–75.
- Vandamme E., Ahouanton K., Mwakasege L., Mujuni S., Mujawamariya G., Kamanda J., Senthilkumar K., and Saito K. (2018). Phosphorus micro-dosing as an entry point to sustainable intensification of rice systems in sub-Saharan Africa. Field Crops Research, 222, 39–49.
- Varotto C., Maiwald D., Pesaresi P., Jahns P., Salamini F., and Leister D. (2002). The metal ion transporter IRT1 is necessary for iron homeostasis and efficient photosynthesis in Arabidopsis thaliana. The Plant Journal, 31(5), 589–599.
- Verbon E. H., Trapet P. L., Stringlis I. A., Kruijs S., Bakker P. A., and Pieterse, C. M. (2017). Iron and immunity. Annual Review of Phytopathology, 55(1), 355–375.
- Wairich A., De Oliveira B. H. N., Wu L. B., Murugaiyan V., Margis-Pinheiro M., Fett J. P., Ricachenevsky F. K., and Frei, M. (2021). Chromosomal introgressions from Oryza meridionalis into domesticated rice Oryza sativa result in iron tolerance. Journal of Experimental Botany, 72(6), 2242–2259.
- Wang Y., and Wu W. H. (2013). Potassium transport and signaling in higher plants. Annual Review of Plant Biology, 64, 451–476.
- Weinstein, L. H., & Robbins, W. R. (1955). The Effect of Different Iron and Manganese Nutrient Levels on the Catalase and Cytochrome Oxidase Activities of Green and Albino Sunflower Leaf Tissues. Plant Physiology, 30, 27–32.
- Welch R. M., Norvell W. A., Schaefer S. C., Shaft J. E., and Kochian L. V. (1993). Induction of iron(III) and copper(II) reduction in pea (Pisum satirum L.) roots by Fe and Cu status: Does the root-cell plasmalemma Fe(III)-chelate reductase perform a general role in regulating cation uptake? Planta, 190, 555-561.
- Wopereis M. C., Diagne A., Johnson D. E., and Seck P. A. (2013). Realizing Africa's rice promise: priorities for action. Realizing Africa's rice promise, 424, 424–436.
- Wu L. B., Holtkamp F., Wairich A., and Frei M. (2019). Potassium ion channel gene Osakt1 affects iron translocation in rice plants exposed to iron toxicity. Frontiers in Plant Science, 10, 1–14.
- Wu L. B., Shhadi M. Y., Gregorio G., Matthus E., Becker M., and Frei M. (2014). Genetic and physiological analysis of tolerance to acute iron toxicity in rice. Rice, 7(1), 1-12.

- Wu L. B., Ueda Y., Lai S. K., and Frei M. (2017). Shoot tolerance mechanisms to iron toxicity in rice (Oryza sativa L.). Plant Cell and Environment, 40(4), 570–584.
- Wu Q., Liu C., Wang Z., Gao T., Liu Y., Xia Y., Yin R., and Qi M. (2022). Zinc regulation of iron uptake and translocation in rice (Oryza sativa L.): Implication from stable iron isotopes and transporter genes. Environmental Pollution, 297.
- Wu Y., Liao W., Dawuda M. M., Hu L., and Yu J. (2019). 5-Aminolevulinic acid (ALA) biosynthetic and metabolic pathways and its role in higher plants: a review. Plant Growth Regulation, 87(2), 357–374.
- Xie K., Cakmak I., Wang S., Zhang F., and Guo S. (2021). Synergistic and antagonistic interactions between potassium and magnesium in higher plants. Crop Journal, 9(2), 249–256.
- Yamauchi M., and Peng X. X. (1995). Iron toxicity and stress-induced ethylene production in rice leaves. Plant and Soil, 173, 21-28.
- Yamauchi T., Colmer T. D., Pedersen O., and Nakazono M. (2018). Regulation of root traits for internal aeration and tolerance to soil waterlogging-flooding stress. Plant Physiology, 176(2), 1118–1130.
- Yang M., Lu K., Zhao F. J., Xie W., Ramakrishna P., Wang G., Du Q., Liang L., Sun C., Zhao H., Zhang Z., Liu Z., Tian J., Huang X. Y., Wang W., Dong H., Hu J., Ming L., Xing Y., and Lian X. (2018). Genome-wide association studies reveal the genetic basis of ionomic variation in rice. The Plant Cell, 30(11), 2720–2740.
- Yang R., Zhou Z., Sun G., Gao Y., and Xu J. (2015). Ferritin, a novel vehicle for iron supplementation and food nutritional factors encapsulation. Trends in Food Science and Technology, 44(2), 189–200.
- Yokosho K., Yamaji N., Ueno D., Mitani N., and Jian F. M. (2009). OsFRDL1 is a citrate transporter required for efficient translocation of iron in rice. Plant Physiology, 149(1), 297–305.
- Yoshida S. (1981). Fundamentals of rice crop science. International Rice Research Institute.
- Yoshino M., and Murakami K. (1998). Interaction of iron with polyphenolic compounds: application to antioxidant characterization. Analytical biochemistry, 257(1), 40-44.
- Zhang X., Zhang F., and Mao D. (1999). Effect of iron plaque outside roots on nutrient uptake by rice (Oryza sativa L.): Phosphorus uptake. Plant and Soil, 209(2), 187–192.
- Zhang Y., Xu Y. H., Yi H. Y., and Gong J. M. (2012). Vacuolar membrane transporters OsVIT1 and OsVIT2 modulate iron translocation between flag leaves and seeds in rice. The Plant Journal, 72(3), 400–410.
- Zhang Y., Zheng G. H., Liu P., Song J. M., Xu G. Di, and Cai M. Z. (2011). Morphological and physiological responses of root tip cells to Fe2+ toxicity in rice. Acta Physiologiae Plantarum, 33(3), 683–689.

## **ANNEXE** (appendix)



**Appendix 1.** (A) Grain yield and (B) leaf bronzing score of 40 genotypes from the initial screening. Data are means  $\pm$  standard errors (n = 6).



**Appendix 2.** (A) Leaf bronzing symptoms and (B) plant appearance during vegetative growth for each selected genotype.



**Appendix 3.** (A) Solar radiation, (B) daily mean temperature and precipitation (C) Genotypic range of growth duration; from transplanting to plant maturity in each year of the experiment. Transplanting date was 06/12/2019 and 12/12/2020 in Yr 1 and Yr 2 respectively.



**Appendix 4.** AGNES dendrogram showing clustering of genotypes based on their whole shoot Fe concentration and content at the booting stage. Height indicates degree of dissimilarity between clusters. Genotypes clustered on the left are Fe 'Includers'; those on the right are 'Excluders'.


**Appendix 5.** Concentrations of Fe in different above-ground tissues at different growth stages. Whole shoot Fe concentrations were calculated from the sum of the individual tissue contents divided by the whole shoot weight. Data are means  $\pm$  standard errors (n = 4).



**Appendix 6.** Concentration of Fe in the soil solution over time in Year 1 up to the plots being drained before harvest. Data are means  $\pm$  standard errors (n = 4).

	Vegetative growth stage (days)		Reproductive growth stage (days)	
-	Year 1	Year 2	Year 1	Year 2
B14339E-KA-28	88	88	153	144
BAHIA		102		166
CIHERANG	105	102	166	166
IR64	88	88	153	144
NERICA-L-43	105	102	166	166
TSIPALA 421	88	88	153	144
X265	88	88	153	144

**Appendix 7.** Durations of vegetative stage (transplanting to booting) and reproductive stage (booting to maturity) in each genotype in each year of the experiment.

**Appendix 8.** Relations between grain yield and other variables obtained using lasso regression. The variables were adjusted to a common scale, so the relative magnitudes of the coefficients indicate the relative importance of the variables. Positive values indicate the phenotype positively influences yield, and vice versa.

Variable	Coefficient	Weighted importance <sup>*</sup>
Fe concentration in stem/leaf sheath at booting	-56.72	100
Biomass of young leaves at flowering	-19.17	66
P concentration at young leaves at booting	-28.49	50
Biomass of old leaves at flowering	27.10	48
Biomass of flag leaves at flowering	25.69	45
Biomass of middle leaves at maturity	22.15	39
P concentration in stem/leaf sheath at maturity	-21.81	38
Biomass of young leaves at booting	-21.39	38
K content in stem/leaf sheath at maturity	-19.56	34
Fe concentration in young leaves at maturity	19.20	34
Fe concentration in young leaves at flowering	-19.17	34
Fe concentration in stem/leaf sheath at booting	-19.14	34

\*cut-off at 30 to avoid confusion with less-important variables

**Appendix 9.** Relations between leaf bronzing score at flowering stage and other variables obtained using lasso regression. The variables were adjusted to a common scale, so the relative magnitudes of the coefficients indicate the relative importance of the variables. Positive values indicate the phenotype positively influences LBS, and vice versa.

Variable	Coefficient	Weighted importance <sup>*</sup>
Fe concentration in middle leaves at booting stage	0.597	100
Whole shoot P content maturity stage	-0.428	72
Biomass of old leaves at booting stage	0.395	66
Fe content in old leaves at flowering stage	-0.359	60
Fe concentration in stem/leaf sheath at flowering	0.147	50

\*cut-off at 30



Appendix 10; Effects of combinatorial fertilizer application on growth and yield. Shoot dry weight at booting (A) and maturity stages (B), as well as grain yield (C) are shown for different treatments. Data are means  $\pm$  standard errors (n = 28). The result of ANOVA is indicated as follows; ns, P > 0.05; \*, P < 0.05; \*\*, P < 0.01; \*\*\*, P < 0.001.



Appendix 11: Effects of Mg on element concentrations in young leaves at the booting stage in the field. The concentrations of Mg, Ca, K and Mn in young leaves at the booting stage are shown for 7 genotypes. Data are means  $\pm$  standard errors (n = 4). The significance level is shown as follows; ns, P > 0.05; \*, P < 0.05; \*\*, P < 0.01; \*\*\*, P < 0.001.