



CATÓLICA
ESCOLA SUPERIOR DE BIOTECNOLOGIA

PORTO

Caracterização de plantas de arroz mutantes no
gene *FRD-like* em relação à homeostase de ferro e
toxicidade por alumínio

por

Ana Catarina Oliveira Tavares

Maio, 2021



CATÓLICA
ESCOLA SUPERIOR DE BIOTECNOLOGIA

PORTO

Caracterização de plantas de arroz mutantes no
gene *FRD-like* em relação à homeostase de ferro e
toxicidade por alumínio

Tese apresentada à Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica Portuguesa
para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia e Inovação

por

Ana Catarina Oliveira Tavares

Local: Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica Portuguesa

Orientador: Doutor Raul Antonio Sperotto

Mai, 2021

Agradecimentos

Após dois anos cheios de desafios, a realização desta dissertação contou com significativos contributos, sem os quais não teria sido possível. Desta forma, dedico os meus votos de gratidão a algumas pessoas que fizeram parte do meu percurso e que sempre me incentivaram.

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer ao meu orientador, Doutor Raul Sperotto, por todo o apoio, disponibilidade, dedicação, amizade e paciência que teve para responder a todas as minhas dúvidas. Agradeço por me ter recebido no Brasil e por ter confiado em mim este tema, apesar de todas as dificuldades.

A todos os que tive oportunidade de conhecer no Brasil. Um obrigada a toda equipa do laboratório de biotecnologia que conheci, pela oportunidade que me disponibilizaram e por todos os ensinamentos que me transmitiram durante o meu período em Lajeado.

Obrigada à Thaina, Manu, Alex, Emílio e Dudu, por me acolherem como se fosse parte da família e por me fazerem sempre sentir em casa. Obrigada pelo carinho e amizade que criamos. Tenho-vos no coração e nunca esquecerei tudo o que fizeram por mim.

Às minhas irmãs e irmão de coração: Fi, Carolina, Gabriel, Sara e Water. Por estarem sempre perto, por me apoiarem em tudo, por me darem tanto amor e carinho e por sonharem comigo. Pelas gargalhadas, pela amizade e pela cumplicidade.

Ao meu irmão João, por todo o companheirismo, por todo o carinho e por tudo o que partilhamos.

À Mãe e ao Pai, por serem os responsáveis pela minha motivação e dedicação. Por me incentivarem sempre a fazer melhor, por me ensinarem a acreditar em mim, por me apoiarem sempre nos meus sonhos e por me tornarem naquilo que sou hoje. Esta vitória também é vossa.

Muito Obrigada.

Resumo

O arroz é um dos cereais mais produzidos e consumidos por grande parte da população. É uma excelente fonte energética, tornando-se um cereal importante principalmente em países em desenvolvimento. Independentemente de o arroz se adaptar às diversas condições de solo e clima, o seu crescimento é afetado por diversos fatores abióticos, destacando-se a deficiência de ferro (Fe) e a toxicidade por alumínio (Al). O Fe é um micronutriente essencial que participa em diversos processos fisiológicos, como a fixação de nitrogênio, produção de hormonas e síntese de DNA. As plantas quando submetidas a níveis de déficit de Fe apresentam duas estratégias: a acidificação da rizosfera e posterior captação de Fe^{2+} , realizada pela maioria das plantas; e a liberação de fitosideróforos que funcionam como quelantes de Fe^{3+} e posterior captação de Fe^{3+} quelado, utilizada apenas pelas gramíneas. O Al também é um fator limitante para o desenvolvimento de plantas de arroz, sendo um dos elementos mais abundantes na terra. A toxicidade de Al manifesta-se de diferentes formas, principalmente na inibição do alongamento das raízes, que afeta a captação de água e nutrientes. Por sua vez, este reduz níveis de crescimento e aumenta a suscetibilidade a fatores de stresse ambiental.

Neste projeto selecionou-se 200 sementes de *Oryza sativa ssp. japonica cv. Nipponbare* e 200 sementes de uma variedade mutante no gene *FRD-like*. As sementes cresceram sob um sistema hidropónico durante 20 dias, seguidamente foram submetidas às diferentes condições: controlo (solução nutritiva), excesso de Al (solução nutritiva com adição de $450 \mu\text{M AlCl}_3$) e deficiência de Fe (solução nutritiva sem adição de Fe - $0 \mu\text{M Fe-EDTA}$). Após 14, 21 e 28 dias de tratamento iniciou-se a recolha de plantas das duas linhagens de forma a analisar a altura da planta, o comprimento da raiz, o peso seco da raiz e da parte aérea, os níveis de clorofila total, e de modo a analisar a expressão de genes envolvidos com a homeostase de Fe e toxicidade de Al, com o intuito de caracterizar fisiologicamente e molecularmente plantas de arroz mutantes no gene *FRD-like* (locus Os12g0106600, um membro da família MATE) em relação ao seu papel na absorção e transporte de Fe e na tolerância à toxicidade por Al. Após a recolha de dados e análise estatística percebeu-se que a parte aérea da linhagem selvagem apresenta, ao longo dos 28 dias, diferenças significativamente superiores praticamente em todos os diferentes meios. O comprimento da raiz destacou-se no meio sem Fe, verificando-se diferenças significativamente superiores na linhagem mutante. No entanto, o peso seco da raiz oscilou durante os 28 dias, nos diferentes meios, sendo que a linhagem selvagem foi a única que apresentou diferenças significativamente superiores, principalmente, no meio controlo. A análise da expressão genética não se realizou devido à pandemia de

Covid-19 que provocou o encerramento das atividades nos laboratórios e a impossibilidade de continuidade do projeto. Em síntese, a linhagem selvagem adapta-se melhor quando submetida à toxicidade de Al e ao déficit de Fe. Esta pesquisa foi útil para começarmos a entender os mecanismos de tolerância ao stresse, os processos de translocação de Fe e a resposta à toxicidade de Al, mas a conclusão deste projeto terá um papel fundamental em programas de melhoramento genético que visem à biofortificação de grãos de arroz.

Palavras-chave: alumínio; arroz; ferro; *FRD-like*; *Oryza sativa ssp. japonica cv. Nipponbare*

Abstract

Rice is one of the most produced and consumed cereals by great part of the population. It is an excellent energy source, making it an important cereal mainly in developing countries. Regardless of whether rice adapts to different soil and climate conditions, its growth is affected by several abiotic factors, notably iron (Fe) deficiency and aluminum (Al) toxicity. Fe is an essential micronutrient that participates in several physiological processes, such as nitrogen fixation, hormone production and DNA synthesis. Plants submitted to Fe deficiency levels present two strategies: rhizosphere acidification and subsequent Fe^{2+} uptake, performed by most of the plants, and the release of phytosiderophores that function as Fe^{3+} chelators and later chelated Fe^{3+} uptake, used only by grasses. Al is also a limiting factor for the development of rice plants, being one of the most abundant elements on earth. The toxicity of Al manifests itself in different ways, notably in the inhibition of the root elongation that affects the uptake of water and nutrients. This reduces growth levels and increases susceptibility to environmental stressors.

In this project, we selected 200 seeds of *Oryza sativa ssp. japonica cv. Nipponbare* and 200 seeds of a mutant lineage in the *FRD-like* gene. The seeds were grown under a hydroponic system for 20 days, then were submitted to different conditions: control (nutritive solution), Al excess (nutritive solution with the addition of $450 \mu\text{M AlCl}_3$) and Fe deficiency (nutritive solution without Fe added - $0 \mu\text{M Fe-EDTA}$). After 14, 21 and 28 days of treatment, plants harvestings of the two strains began in order to analyze plant height, root length, root and shoot dry weight, total chlorophyll levels and the expression of genes related with Fe homeostasis and Al toxicity, in order to characterize physiologically and molecularly mutant rice plants in the *FRD-like* gene (locus Os12g0106600, a member of the MATE family) in relation to their role in the absorption and transport of Fe and in Al toxicity tolerance. After data collection and statistical analysis, it was noticed that the shoots of the wild line shows, over the 28 days, significantly higher differences in practically all different conditions. The root length stood out in the medium without Fe, with significantly higher differences in the mutant lineage. However, the root dry weight fluctuated during the 28 days, in the different media, being the wild lineage the only one that showed significantly higher differences, mainly in the control conditions. The analysis of gene expression was not carried out due to the Covid-19 pandemic that caused the laboratories closing and avoid the continuity of

the project. In summary, the wild plants adapt better when subjected to Al toxicity and Fe deficiency. This research was useful to begin to understand the mechanisms of stress tolerance, Fe translocation processes and the response to Al toxicity, but the conclusion of this project will have a fundamental role in genetic improvement programs aimed at the biofortification of rice grains.

Keywords: aluminum; *FRD-like*; iron; *Oryza sativa ssp. japonica cv. Nipponbare*; rice

Índice

Agradecimentos.....	I
Resumo.....	II
Abstract.....	IV
Índice.....	VI
Lista de figuras.....	VIII
Lista de Abreviaturas.....	IX
1. Introdução.....	1
2. Revisão Bibliográfica.....	3
2.1 Cultura do arroz.....	3
2.2 Cultura de arroz no mundo.....	3
2.3 Importância do arroz na nutrição.....	4
2.4 Família MATE.....	5
2.5 Toxicidade por alumínio.....	7
2.6 Mecanismos de defesa perante o Al.....	8
2.7 Défice de Ferro.....	10
2.8 Importância do Ferro na alimentação.....	10
2.9 Importância do Ferro na nutrição das plantas.....	11
2.10 Mecanismos de resposta a baixos níveis de Ferro.....	11
3. Objetivos.....	14
3.1 Objetivo geral.....	14
3.2 Objetivos específicos.....	14
4. Material e Métodos.....	15
4.1 Material Vegetal.....	15

4.2 Crescimento hidropónico.....	15
4.3 Caracterização fisiológica.....	17
4.4 Recolha do material para análises de expressão genética por RT – qPCR	18
4.4.1 Extração de RNA.....	18
4.4.2 Quantificação de RNA utilizando o Qubit.....	19
4.4.3 Síntese do cDNA.....	19
4.4.4 Análise da expressão génica através RT-qPCR.....	20
4.5 Análise estatística.....	20
5. Resultados	21
5.1 Variáveis de crescimento.....	21
5.2 Pigmentos Fotossintéticos.....	23
5.3 Análise da expressão genética	24
6. Discussão.....	25
7. Conclusão.....	29
8. Referências Bibliográficas.....	30

Lista de Figuras

Figura 1 - Estratégia I: mecanismo de absorção de Fe nas raízes das plantas. Adaptado de Kobayashi e Nishizawa, 2012.....	12
Figura 2 - Sistema hidropónico montado com caixas de ponteiras.....	16
Figura 3 - Plantas selvagens nos diferentes meios.....	17
Figura 4 - Plantas mutantes nos diferentes meios.....	17
Figura 5 - Altura da parte aérea de <i>Oryza sativa ssp. japonica cv. Nipponbare</i> e da variedade mutante submetidas ao controlo, à deficiência de Fe e à toxidez por Al por um período de 14, 21 e 28 dias.....	21
Figura 6 - Comprimento da raíz de <i>Oryza sativa ssp. japonica cv. Nipponbare</i> e da variedade mutante submetidas ao controlo, à deficiência de Fe e à toxidez por Al por um período de 14, 21 e 28 dias.....	22
Figura 7 - Matéria seca da parte aérea de <i>Oryza sativa ssp. japonica cv. Nipponbare</i> e da variedade mutante submetidas ao controlo, à deficiência de Fe e à toxidez por Al por um período de 14, 21 e 28 dias.....	22
Figura 8 - Matéria seca da raíz de <i>Oryza sativa ssp. japonica cv. Nipponbare</i> e da variedade mutante submetidas ao controlo, à deficiência de Fe e à toxidez por Al por um período de 14, 21 e 28 dias.....	23
Figura 9 - Concentração de clorofila total em folhas de plantas de <i>Oryza sativa ssp. japonica cv. Nipponbare</i> e variedade mutante submetidas ao controlo, à deficiência de Fe e à toxidez por Al por um período de 14, 21 e 28 dias.....	24

Lista de abreviaturas

ABC – *ATP – binding cassette*

Al - alumínio

Al⁺³ – alumínio na forma trivalente

AlCl₃ – cloreto de alumínio

AOs – ácidos orgânicos

ART1 - Aluminum Resistance Transcription Factor 1

ASR5 – ácido abscísico, stresse e maturação

ATP - trifosfato de adenosina

cDNA - DNA complementar

cm – centímetros

Ct - cycle threshold

CuSO₄ - sulfato de cobre

DNA – ácido desoxirribonucleico

DNase - desoxirribonuclease

dNTPs - desoxirribonucleotídeos fosfatados

DMA - 2-deoximugineico

EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético

ERO – espécies reativas de oxigênio

epi-HMA - 3-epihidroximugineico

epi-HDMA - 3-epihidroxi 2'-deoximugineico

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations

Fe - ferro

Fe⁺² – ferro no estado férrico

Fe^{+3} – ferro no estado ferroso

H_2O – água

H_3BO_3 – ácido bórico

HCl - ácido clorídrico

KCl – cloreto de potássio

K_2SO_4 – sulfato de potássio

KH_2PO_4 – fosfato de potássio

L - litro

LHCA 1 - Proteína de ligação 6 de clorofila ab

LHCA 2 - Proteína de ligação 2 de clorofila ab do fotossistema I

LHCA 4 – Proteína de ligação 4 de clorofila ab

MA - ácido mugineico

MATE – *Multidrug and toxic compound extrusion*

$\text{MCa}(\text{NO}_3)$ – nitrato de cálcio

mg – miligrama

MgCl_2 – cloreto de magnésio

MgSO_4 – sulfato de magnésio

MnSO_4 – sulfato de manganês

mRNA – RNA mensageiro

NA - Nicotianamina

NaOH – hidróxido de sódio

NAS – Nicotianamina sintase

$(\text{NH}_4)_6\text{MO}_7\text{O}_{24}$ – molibdato de amónio

nm – nanómetro

OsFRDL - *reductase defective ferric like*

OsFRDL1 – *reductase defective ferric like 1*

OsFRDL2 – *reductase defective ferric like 2*

OsFRDL4 – *reductase defective ferric like 4*

PCR – polymerase chain reaction

pH - potencial de hidrogénio

primer F - primer forward

primer R – primer reverse

PS - fitosideróforos

PS I – fotossistema I

PS II - fotossistema II

RNA – ácido ribonucleico

rpm – rotações por minuto

rt-qPCR – PCR em tempo real quantitativo com transcrição reversa

STAR1 - sensitive to Al rhizotoxicity 1

STAR2 - sensitive to Al rhizotoxicity 2

μL - microlitro

UBQ5 – ubiquitina 5

UDP-glicose – uridina difosfato glicose

UNIVATES – Universidade do Vale do Taquari

WS – working solution

YSL – *yellow stripe like*

ZnSO₄ – sulfato de zinco

1. INTRODUÇÃO

O arroz (*Oryza sativa* L.) é considerado pela FAO (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*) um dos cereais mais importantes, sendo um dos mais produzidos e consumidos no mundo, juntamente com o trigo (*Triticum aestivum*) e o milho (*Zea mays*) [1]. Consideramos a cultura de arroz de extrema importância, uma vez que é uma das principais fontes de alimentação para quase dois terços da população mundial, além de apresentar uma extensa área cultivada [1].

O cultivo de arroz ocorre em todos os continentes (excepto na Antártida), sendo que aproximadamente 90% ocorre na Ásia, principalmente na Índia e na China [1]. Em Portugal atualmente produz-se cerca de 180×10^3 toneladas de arroz numa área de cultivo de 30×10^3 hectares, o que representa cerca de metade do consumo doméstico [2]. No ranking da União Europeia (UE) de produção de arroz, Portugal encontra-se na quarta posição, sendo responsável por cerca de 6% da produção [3]. No Brasil, em 2019, produziu-se cerca de 12 milhões de toneladas, o que permite classificar o país como o maior produtor fora do continente asiático. O Rio Grande do Sul (RS), região a sul do Brasil, destaca-se pela elevada produtividade, cultivando, neste mesmo ano, uma área de aproximadamente 984.081 hectares, e produzindo, na safra 2018/2019, 8.474.392 toneladas do grão [4].

A espécie de arroz *Oryza sativa* é proveniente da espécie selvagem *Oryza rugipogon*, nativa do Sul da Ásia [5-6]. A produção de plantas de arroz pode ser realizada em todos os continentes, situação que implica que as áreas de cultivo respondam a uma vasta variedade de condições climáticas e ambientais. Desta forma, o rendimento dos grãos depende dos múltiplos stresses bióticos ou abióticos a que a planta é exposta. Consequentemente, há a necessidade de resposta aos diversos fatores sem o comprometimento da colheita de forma a manter a produtividade. Esta pode ser afetada através de características físicas e químicas do solo, como défices nutricionais e/ou a presença de elementos tóxicos [7-8]. A interação entre estas características, ou seja, entre a presença de elementos fitotóxicos concomitante com a deficiência de nutrientes, é um campo de estudo complexo que necessita ser mais explorado, uma vez que é uma área que pode promover um aumento no rendimento das culturas agrícolas.

Os solos portugueses onde estão presentes os arrozais (vales do Sado, Mondego, Tejo e Sorraia) são considerados solos podzóis, ou seja, são naturalmente ácidos, mas que facilmente se tornam mobilizáveis e produtivos, quando fertilizados [9]. Do mesmo modo, os solos brasileiros também são naturalmente ácidos e com a presença elevada de alumínio (Al)

na forma trivalente (Al^{3+}). A maioria dos vegetais sofre consequências devido a estas características tóxicas, vendo o seu crescimento radicular ser inibido após uma exposição das raízes a soluções de Al [10-11]. Por outro lado, o ferro (Fe), para além de ser essencial à nutrição humana, é um elemento essencial no desenvolvimento das plantas. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a carência de micronutrientes na alimentação afeta, principalmente, os países subdesenvolvidos [12]. O défice de Fe em humanos está correlacionado com a desnutrição, a anemia e com adversidades no desenvolvimento cognitivo e comportamental na infância [13].

O Fe é um micronutriente essencial nas plantas em diferentes processos como a respiração, a fotossíntese ou a biossíntese de clorofila [14]. A cultura de arroz pode enfrentar diferentes concentrações de Fe dependendo das condições de cultivo. Nos solos calcários, o défice de Fe pode atingir níveis rigorosos. Em contrapartida, nos solos alagados, os níveis de Fe são elevados, com a possibilidade de se tornarem tóxicos.

A planta perante estas situações, défice de Fe ou excesso de Al, desenvolve mecanismos de estratégia que permite responder da melhor forma, viabilizando a chegada do nutriente ao grão, e que este seja fornecido na alimentação humana.

A atual procura por uma alimentação mais variada, de melhor qualidade e por alimentos em maior quantidade, indica-nos que este estudo para além de nos permitir entender os mecanismos de tolerância ao stresse, a resposta à toxicidade de Al e ao défice de Fe, também tem um papel indispensável em programas de melhoramento genético que direcionem a biofortificação de sementes de arroz.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Cultura do arroz

O arroz (*Oryza sativa L.*) é considerado um alimento essencial para mais de metade da população mundial, sendo classificado pela FAO (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*) como um dos alimentos fundamentais na nutrição humana [1].

A domesticação das culturas de arroz inclui a seleção de diversos fatores naturais de plantas selvagens que viabilizaram características úteis na agronomia. Essas particularidades correlacionam-se com o tamanho e estrutura das plantas, efeitos na germinação e no fotoperíodo [15]. Ao longo dos tempos, tem existido controversas na origem e no processo de domesticação do arroz devido à origem geográfica, ao tipo de arroz selvagem *O. rufipogon* que beneficiou como progenitor e se as subespécies obtidas são provenientes de uma ou mais domesticação [16].

O arroz cultivado asiático *O. sativa L.* foi domesticado há cerca de 10 mil anos, pelo ancestral selvagem *O. rufipogon*, na região do Vale do Rio Yangtzé na China, proporcionando três subespécies de arroz: *indica*, *japonica* e *javanica*, sendo que 80% do cultivo mundial corresponde à *indica*. Estes três grupos variam em diversas propriedades, como a diferente região onde evoluiu (Índia, China e Indonésia), a tolerância às secas, a tolerância às baixas temperaturas, o índice de crescimento, na eficiência da fotossíntese, entre outras [17-21].

2.2 Cultura de arroz no mundo

Atualmente, o arroz é o segundo cereal mais produzido no mundo, com uma produção média de 500 milhões de toneladas [1]. Este cereal possui um papel importante na alimentação básica da população, principalmente no continente asiático, visto que é um dos maiores produtores e consumidores de arroz, produzindo cerca de 90% do arroz mundial. No continente americano, o Brasil é o maior produtor de arroz, sendo o estado do Rio Grande do Sul o maior produtor de arroz irrigado [22].

O mercado mundial do arroz é elaborado pelos países responsáveis pela importação e dividido conforme a qualidade e o tipo de grão. Segundo a FAO, o consumo mundial *per capita* de arroz é de 58 kg.hab⁻¹ano⁻¹. Todavia, tem se notado um crescimento nas últimas seis décadas. A Birmânia, a China e a Indonésia representam os maiores consumidores, com

uma média de 80 kg.hab⁻¹ano⁻¹. O nível intermédio de consumo *per capita* é ocupado pelo Brasil, a Colômbia e o Senegal, com valor que oscila entre 40 a 60 kg.hab⁻¹ano⁻¹. Os Estados Unidos e grande parte dos países da Europa enquadram-se no baixo consumo *per capita*, com cerca de 10 kg.hab⁻¹ano⁻¹ [23]. Na União Europeia (UE), a maioria da produção de arroz encontra-se concentrada nos Estados-membros do Sul, principalmente Bulgária, Espanha, França, Grécia, Hungria, Itália, Portugal e Roménia. Portugal é o quarto maior produtor da UE, representando cerca de 6% da produção total. Portugal destaca-se acima da média da UE, com um consumo *per capita* de 17 kg de consumo estimado anualmente [24].

Segundo as estimativas, até 2030, o crescimento populacional tem uma predisposição a aumentar, o que deverá ser acompanhado pela produção de arroz. Este crescimento deve-se ao facto de estarmos presente perante uma cultura multifuncional, que se adapta a diferentes condições, permitindo considerá-la como uma espécie de grande impacto no combate à fome no mundo [25].

2.3 Importância do arroz na nutrição

O arroz está integrado na base da pirâmide alimentar, apresentando um grande valor nutricional que permite um balanceamento nutricional e a revogação das necessidades de alguns minerais [26]. Este representa, aproximadamente, 20% da ingestão mundial de energia e 15% do aporte de proteína. A sua elevada concentração de amido, em torno de 75%, permite classificá-lo como uma boa fonte de energia. Este também fornece água (12%), proteínas (7%), vitaminas e minerais (2,4%), fibras (2%) e um baixo valor de lípidos (1,6%) [27]. A proteína do arroz é de excelente qualidade, dado que integra os oito aminoácidos mais importantes para o homem, que associadas a leguminosas, origina um valor proteico mais benéfico [28].

Existem diversas variantes como as condições de manipulação ou de armazenamento, variações ambientais ou até mesmo os componentes presentes no endosperma e/ou farelo do arroz que podem influenciar os componentes bioquímicos, afetando as funções metabólicas e a qualidade nutricional, originando efeitos no organismo humano [29]. Desta forma, a saúde humana é diretamente influenciada pela qualidade nutricional do arroz, devido à sua importância na dieta da maioria da população, principalmente nos países em desenvolvimento (baixo e médio nível económico).

Estudos evidenciam que o arroz tem efeitos benéficos para a saúde, expressando-se no controlo da glicose sanguínea, na diminuição dos lipídios séricos e da pressão arterial e na providência e controlo de doenças crónicas, como doenças cardiovasculares e diabetes [30-34].

De forma a melhorar a característica nutricional do arroz tem-se realizado pesquisas na área do melhoramento genético, sendo que já foi possível adquirir grãos de arroz com um teor de vitamina A, ferro, zinco e alguns aminoácidos superior ao normal [35]. A sua produção e consumo devem ser continuamente monitorizados e avaliados em profundidade, visto que este cereal é considerado de extrema importância para a segurança alimentar da população mundial. No entanto, este cereal ainda não é devidamente reconhecido pelas suas características funcionais, principalmente, pela capacidade de prevenir doenças, ajudar no tratamento e ter efeito na respetiva cura, em função dos componentes que possui.

2.4 Família MATE

A multi drug and toxic compound extrusion (MATE) é uma família genética que pode ser decomposta em 15 subfamílias e os seus membros dividem-se entre os organismos vivos de forma geral. Destas 15 subfamílias, sete são características de bactérias, três retratam proteínas identificadas apenas em bactérias e arqueobactérias, três apresentam proteínas exclusivas de eucariotas, principalmente animais, leveduras e plantas, uma inclui proteínas de vegetais e bactérias e, por fim, uma constituída somente por proteínas de arqueobactérias [36].

Desde a descoberta de novas proteínas MATE em vegetais foi constatado o relacionamento desta família com as variadas funções fisiológicas, uma vez que esta envolve alguns membros com ligação a diversificadas espécies moleculares. Por causa disso, exercem diversas funções nos organismos vegetais, desde o transporte de nutrientes, como Fe, até ao transporte de ácidos orgânicos, hormonas e metabolitos secundários [37].

Estas proteínas são representadas, tanto em organismos eucariotas assim como em procariotas, por uma família de transportadores secundários distintos de outros transportadores de resistência a diversas drogas [38-40]. No genoma da *Arabidopsis* e do arroz, há no mínimo 40 e 50 membros da família MATE, respetivamente [41-43]. A maior parte dos membros desta família contém 440-550 aminoácidos com 12 hélices transmembranares (TM). As proteínas MATE partilham cerca de 40% de similaridade de

sequência, porém, ao que tudo indica, não existe uma sequência consenso conservada em todos os componentes da família. As plantas apresentam diversos transportadores MATE em comparação com o reino animal e bacteriano, que apresenta um número relativamente baixo de genes MATE por espécie [41][43]. As atividades da família MATE necessitam do gradiente eletroquímico de cátions (como íons H^+ ou Na^+) para transportar substratos através da membrana [44].

Diversos estudos revelaram que as múltiplas funções do MATE são consolidadas com a vasta gama de transporte de substratos como alcaloides, ácidos orgânicos, flavonoides, hormonas vegetais e metabolitos secundários [45-47]. Entre estes, uma série de membros que transportam citrato encontra-se implicada no transporte de Fe das raízes para os brotos e na desintoxicação de Al em diversas plantas. Estas proteínas encontram-se na membrana plasmática e exibem uma atividade de transporte de efluxo de citrato [48-55].

As funções adicionais dos transportadores MATE foram explicadas e divididas em três grupos apoiado nas atividades determinadas nas plantas. O primeiro grupo está incluído na resistência a doenças [56-57]. O segundo grupo de proteínas MATE segrega, para fora das células, pequenas moléculas orgânicas como o Al, e age como agentes quelantes ou ligantes, evitando danos nas plantas [58-59]. O último grupo está presente nos vacúolos, principal componente de armazenamento da maior parte das formas conjugadas, e permite o transporte de flavonoides e de metabolitos secundários [60-61]. Por existirem poucos estudos sobre os genes MATE no arroz, ainda não se conseguiu analisar com precisão as funcionalidades dos mesmos.

Entre os cerca de 50 membros genes MATE há três membros (*OsFRDL1*, *OsFRDL2* e *OsFRDL4*) que fazem parte dos transportadores de nitrato [62]. No arroz, a expressão de *OsFRDL1* não apresenta respostas claras em relação ao tratamento de défice de Fe, sendo que os mutantes *OsFRDL1* (Os03g0216700) apresentam clorose provocada pela reduzida concentração de Fe nas folhas [42]. O estudo de Yokosho et al. constatou que a expressão do gene *OsFRDL4* (Os01g0919100) é relativamente baixa em situações normais, no entanto, esta aumenta bastante quando o Al está presente. Verificou-se que este gene não está implicado no transporte de Fe no arroz, contudo é um agente na desintoxicação externa de Al [63]. Estudos demonstram que o *OsFRDL2* (Os10g0206800) não se encontra implicado no transporte de Fe, mas na secreção de citrato instigada pelo Al na raiz. Porém, contrariamente ao *OsFRDL4*, a secreção de citrato entreposto por *OsFRDL2* optou por uma direção oposta o que torna a sua contribuição relativamente pequena em relação à tolerância ao Al [64].

Há estudos que sugerem que o *OsFRDL1* atua ao longo do transporte ativo de Fe das raízes para os brotos, sob a forma de um complexo ferro-ácido cítrico, no momento do crescimento vegetativo, tal como no decurso da distribuição de Fe para as panículas no período de reprodução [42]. Do mesmo modo, o *OsFRDL4*, além de ser um dos componentes de elevada tolerância ao Al, codifica um transportador de ácido nítrico provocado pelo Al posicionado na membrana plasmática das células da raiz do arroz [64].

2.5 Toxicidade por alumínio

A produção de culturas em todo o mundo é afetada por múltiplos fatores abióticos, como a adaptação das plantas aos diferentes tipos de solos, tendo estas, por exemplo, que se ajustar aos défices ou toxicidades de nutrientes [65].

A crosta terrestre é constituída consideravelmente por alumínio (Al), principal poluente ambiental, que origina os solos devido à forma de minerais secundários na qual o Al se encontra. Em solos com um pH inferior a 5,5, o Al encontra-se na forma de ião Al^{3+} , tendo como resultado a toxicidade no sistema radicular, limitando o crescimento das plantas e diminuindo significativamente a produção de arroz [66-69]. Mais de 50% da terra cultivável é ácida, e destes 13% são utilizados para produzir arroz. Apesar de o arroz ser uma das culturas mais resistentes ao Al, o facto da maioria dos solos ácidos se encontrar nos países em desenvolvimento, limita a produtividade dificultando o combate à fome nestes países [70].

A toxicidade do Al provém da interação deste com a parede celular, a membrana plasmática e com o citosol das células [66]. Esta exposição nas plantas dificulta a absorção de nutrientes e de água por parte das raízes, inibindo o desenvolvimento destas, diminuindo a taxa de divisão celular e condensando as paredes celulares das raízes [71]. O sistema radicular é o primeiro local onde ocorre a interação entre o Al e a planta, havendo absorção deste no sistema. Esta interação origina o primeiro sintoma no momento em que o Al se conecta à parede celular da rizoderme e do córtex externo [72].

O facto do Al se agregar a grupos de fosfatos na membrana pode ser um dos factores pelo qual a permeabilidade da membrana plasmática das células do sistema radicular é afetada [71]. Este fator restringe o crescimento radicular afetando o crescimento e desenvolvimento das culturas [72]. Estudos indicam que esta toxicidade origina uma alteração no ciclo celular e uma diminuição da atividade mitótica, ou seja, provoca danos no

citoesqueleto que alteram os microtúbulos e microfilamentos impedindo o alongamento ou a divisão celular, prejudicando assim o desenvolvimento da planta [73-75]. Esta alteração no processo mitótico pode ter como consequência um crescimento irregular das raízes, uma vez que o Al é sobretudo condensado no núcleo, enquanto o ciclo celular é, principalmente, inibido ao nível da replicação do DNA [76-80].

Conforme o pH, o Al pode envolver-se com os lípidos da membrana e as proteínas e cooperar no desenvolvimento de ligações cruzadas entre pectinas e proteínas na parede celular, provocando uma diminuição na integridade da membrana [81-82].

Ao nível do sistema radicular, as raízes das plantas quando estão sob stresse de Al apresentam-se frágeis, atrofiadas, de cor escura e ocorre um aumento na espessura da parede celular, o que torna as raízes menos aptas à absorção de água e nutrientes, visto que esta é despolarizada e alguns processos celulares, entre eles o transporte de iões, são afetados [83-85].

2.6 Mecanismos de defesa perante o Al

De acordo com Fleming e Foy (1964), a flexibilidade das plantas perante uma adversidade, como a toxicidade de Al, está relacionada com a capacidade de a divisão e a alongação celular continuar a realizar-se, com redução do Al disponível devido à alteração do ambiente radicular e com a probabilidade de as áreas meristemáticas permitirem a formação de novos tecidos [86].

Um dos principais eventos de resposta de defesa das plantas é a produção de espécies reativas de oxigénio (ERO) que fortalecem as paredes celulares vegetais de forma a impossibilitar a entrada de agentes patogénicos e reproduzindo moléculas de sinalização que cooperam na evolução e defesa da planta [87]. A toxicidade de Al promove um aumento de ERO que, por consequência, influencia negativamente o metabolismo celular levando a um aumento na peroxidação da membrana lipídica, oxidação de lípidos e proteínas, desnaturação de proteínas, danos no DNA, diminuição da atividade enzimática e, em casos mais críticos, pode ocorrer morte celular [88-89]. Contudo, há plantas que são capazes de desenvolver estratégias para superar a toxicidade de Al.

Há dois tipos de mecanismos principais: um que bloqueia a entrada de Al no ápice da raiz, e outro que tolera, ou seja, o metal penetra na planta, mas é capturado nos vacúolos [66].

Outros mecanismos como o aumento do pH da rizosfera, o aumento da atividade de enzimas antioxidantes e o aumento da complexação do Al^{3+} com compostos orgânicos, também são utilizados para defender a planta [90-92]. De forma a eliminar o efeito tóxico do Al, as plantas desenvolveram uma estratégia de segregação de substâncias quelantes, como os ácidos orgânicos (AOs), mais especificamente, citrato, malato e oxalato [93-94]. Os AOs localizados no citosol são aniões desprotonados que, quando submetidos à toxicidade do Al, são secretados para a rizosfera, quelando o Al^{3+} tóxico e formando um complexo controlado que não é absorvido pelas raízes [89]. Para que a planta tolere o Al, esta necessita desenvolver uma intensa regulação da expressão genética. O Al estimula a expressão de uma série de genes de tolerância ao Al associados a variados mecanismos como *ASR5* (*Abscisic stress-ripening protein 5*), *STAR1* (*Sensitive to Al rhizotoxicity 1*), *FRDL4* (*Reductase defective ferric like 4*) [66].

De modo a obtermos uma cultura de arroz livre de toxicidade de Al, há a necessidade de formar um complexo com as proteínas *STAR1* e *STAR2* (*Sensitive to Al rhizotoxicity 2*) que codificam, respetivamente, uma proteína de domínio transmembranar e uma proteína de ligação a ATP. Este complexo atua como um transportador de perfil ATP-binding cassette (ABC) que transporta uridina difosfato glicose (UDP-glicose), alterando a parede celular e modificando os locais de ligação de Al [95-96]. A *FRDL4* é uma proteína que pertence à família de compostos tóxicos e multidrogas (MATE) que codifica um transportador de citrato induzido pelo Al, localizado na membrana plasmática das células das raízes do arroz, e que se envolve na secreção do citrato. A proteína *FRDL4* participa nos processos de tolerância ao Al no arroz [97]. As proteínas *ASR5* são detetadas no citoplasma, no cloroplasto e no núcleo. A planta fica sensível ao Al quando esta é silenciada para *ASR5*, ao contrário da planta exposta ao Al que apresenta níveis de transcrição aumentados nas raízes e na parte aérea [98-99]. Estas proteínas formam uma família de proteínas específicas de plantas que implicam no stresse abiótico e biótico [100-101]. Elas regulam um amplo número de genes reativos ao Al, no qual se inclui o *STAR1* [102]. Entre os diferentes genes regulados pela *ASR5*, há dois que são regulados pela *ART1* como o *STAR1* e o *OsFRDL4*. Para que *ASR5* e *ART1* (Aluminum Resistance Transcription Factor 1) possam expressar o gene *STAR1* induzido pelo Al, estes têm que se relacionar e funcionar diretamente um com o outro [102].

2.7 Déficit de Ferro

O ferro (Fe) é outro elemento essencial que se encontra na crosta terrestre em grande quantidade. Este apresenta um papel importante na litosfera, apresentando concentrações que variam entre 0,7% a 55% [103]. Este metal encontra-se no solo na forma reduzida Fe^{+2} (também designado por ferroso), no entanto esta pode sofrer oxidações originando Fe^{+3} (também designado por férrico), e apresentar baixa solubilidade. As duas formas podem ser absorvidas pelas plantas, no entanto o Fe^{+3} é pouco solúvel e, regra geral, encontra-se precipitado e quelado. Assim, a forma reduzida predomina na absorção, uma vez que nos solos calcários onde o pH é alcalino (entre 7,4 e 8,5) os minerais que envolvem Fe denotam uma reduzida solubilidade e uma dissolução cinética tardia [104-106].

A deficiência de Fe tem bastante impacto visto que é uma adversidade nutricional de elevada proporção que influencia numerosas espécies agrícolas. A sensibilidade de cada cultivar pode originar perdas na produção, e em situações críticas pode ocorrer uma perda completa da cultura [107].

2.8 Importância do Ferro na alimentação

O Fe é um elemento importante tanto para o metabolismo vegetal como para a alimentação humana. Nos animais, tem como função biológica o transporte de oxigénio, dado que é um constituinte de proteínas como hemoglobina e à mioglobina [108]. Além do mais, este metal é fundamental para diversas funções relacionadas com a atividade muscular, o crescimento, a força óssea, a imunidade e o sistema nervoso [109].

Mundialmente, a deficiência de Fe é o distúrbio nutricional mais comum na dieta humana e, de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), tem impacto em 30 a 50% da população mundial, sendo que os alvos mais propensos são os idosos, as crianças e as mulheres em idades férteis [110-112]. A melhor possibilidade com melhor relação custo-benefício é a biofortificação das plantas de modo a se obter uma maior eficácia no fornecimento de Fe [113].

Em vista disso, e de forma a aprimorar a qualidade e a eficácia das culturas, há a necessidade de se conhecer mais profundamente os mecanismos de absorção, transporte e homeostase do Fe.

2.9 Importância do Ferro na nutrição das plantas

O desenvolvimento das plantas necessita do nutriente ferro, uma vez que este atua como cofator de variadas enzimas que estão associadas a importantes processos metabólicos, como fixação do nitrogênio, fotossíntese, respiração, síntese de clorofila e citocromos [107][114]. Os principais utilizadores de ferro são os cloroplastos, as mitocôndrias e os perioxissomas na realização das reações redox (oxidação/redução) [115].

Este metal tem a capacidade de estruturar complexos com diversos ligantes orgânicos e modificar a sua condição oxido-redutiva [116-118]. Contudo, as propriedades físicas do ferro também o fazem atuar como um elemento tóxico, além do seu efeito cofator e catalisador das reações redox [118]. O ferro apresenta um mecanismo complexo perante um balanço homeostático, constituindo duas situações principais: déficit como produto de dificuldades na presença de baixa solubilidade em condições aeróbicas, e toxicidade quando presente em alta solubilidade em condições anaeróbicas [119].

O déficit de Fe debilita o desenvolvimento das plantas reduzindo o crescimento do meristema apical, provocando cloroses nas folhas e um envelhecimento, tanto das folhas como das raízes [120-122].

2.10 Mecanismos de resposta a baixos níveis de Ferro

De forma a combater adversidades como a baixa disponibilidade de Fe, as plantas desenvolveram mecanismos para facilitar e aumentar a capacidade de absorção: uma estratégia redutora, na qual ocorre a redução de Fe^{+3} a Fe^{+2} antes de este ser transportado, e uma estratégia complexante em que o Fe^{+3} livre é quelatado de forma a aumentar a sua absorção. Estes mecanismos foram descritos em 1986 por Romheld e Marschner, e foram classificados, respetivamente, como: Estratégia I (em plantas não-gramíneas) e Estratégia II (em plantas gramíneas) [123].

A **estratégia I** baseia-se numa resposta coordenada que inclui uma redução de Fe^{+3} a Fe^{+2} pela FRO2 (Ferric-chelate reductase oxidase) antes de este ser conduzido pelo transportador IRT1 (Iron-Regulated Transporter 1) para o interior da célula [124-125]. Esta redução permite absorver ferro da raiz por meio da redução de quelatos de Fe^{+2} associados ao acréscimo da síntese de transportadores de Fe^{+2} , a acidificação da rizosfera e a captação dos iões ferrosos formados por meio da membrana plasmática da raiz [106][124][126]. Outra

forma é através da secreção de compostos fenólicos e prótons para a rizosfera, que contribuem para o aumento da solubilidade de íons férricos e na competência de reduzir o Fe na superfície da raiz (Figura 1) [119].

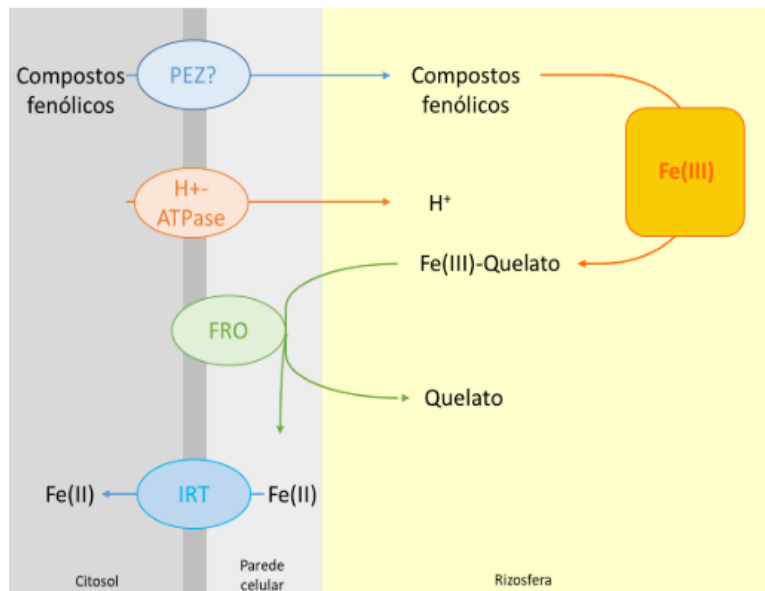


Figura 1- Estratégia I: mecanismo de absorção de Fe nas raízes das plantas. Adaptado de Kobavashi e Nishizawa. 2012.

A **estratégia II** desenvolveu-se nas gramíneas, como o arroz (*Oryza sativa*), a cevada (*Hordeum vulgare*), o milho (*Zea mays*) e o trigo (*Triticum aestivum*). Sucede-se a libertação de fitosideróforos (PS), compostos de baixa massa molecular pertencentes à família dos ácidos mugineicos (MAs), que inclui o ácido mugineico (MA), o 2-deoximugineico (DMA), o 3-epihidroximugineico (epi-HMA) e o 3-epihidroxi 2'-deoximugineico (epi-HDMA) [114][127]. Estes são sintetizados nas vesículas e secretados na raiz, sob deficiência de Fe, de forma a aumentar a absorção deste [128]. As moléculas de fitosideróforos apresentam elevada afinidade e propriedades minerais quelantes que permitem a sua ligação ao Fe³⁺ na rizosfera, formando o complexo Fe³⁺-PS, que é transportado por proteínas transportadoras específicas sem a necessidade de ocorrer uma redução extracelular [129-131]. A nicotianamina (NA), precursora e essencial na síntese dos ácidos mugineicos, é sintetizada pela família génica *NAS* (*Nicotianamina sintase*). O interior das células das raízes recebe, através de transportadores específicos da família Yellow Stripe-Like (YSL), os complexos formados, devidamente reconhecidos, tornando-se fontes de ferro na planta [132-135]. Para

além destas estratégias citadas, a absorção de Fe também é sustentada por alterações morfológicas na raiz e um aumento na concentração de citrato no floema [136].

Embora o arroz pertença à classe das Poáceas monocotiledôneas que utiliza a estratégia II, já foi provado que este também tem capacidade de absorver Fe^{2+} diretamente da rizosfera [137].

Na membrana plasmática localizam-se os transportadores IRT (Iron-Regulated Transporter), sendo que constituintes da família destes transmissores são referidos como responsáveis pela absorção de metais fundamentais na rizosfera [138-139]. Bughio et al (2002) identificou, no arroz, homólogos do gene *IRT1* depois de isolarem o *OsIRT1*, codificante para uma proteína transportadora de Fe^{2+} , comprovando a sua expressão em raízes. Isto permite afirmar que o arroz também é apto para absorver Fe^{2+} na rizosfera. Consequentemente, as plantas de arroz absorvem, através do transportador OsIRT1, Fe^{2+} , além da absorção de Fe^{3+} ligado a PS [140].

Conforme a reduzida solubilidade e elevada reatividade, para ocorrer a translocação do Fe há a necessidade deste estar associado a moléculas quelantes, e com o estado redox ajustado entre a forma ferrosa e férrica [141]. Assim sendo, o arroz é capaz de utilizar as duas estratégias de absorção de Fe. Esta capacidade relaciona-se com o facto de o arroz ter uma característica adaptativa, visando que em solos inundados a disponibilidade de Fe^{2+} é superior à de Fe^{3+} [137].

A deficiência de Fe em *Arabidopsis* e arroz induz a expressão de genes que codificam enzimas biossintetizantes fundamentais para a formação de fitosideróforos e transportadores que crescem a absorção, solubilidade e translocação [106][126]. Nas plantas, para uma fotossíntese eficaz, há a necessidade de uma correta homeostase de Fe. Uma baixa quantidade de Fe modifica a estrutura e síntese dos cloroplastos, dificultando o transporte de eletrões entre o fotossistema II (PSII) e o fotossistema I (PSI) [142].

Há situações que sofrem alterações devido ao défice de Fe, como a diminuição na capacidade das proteínas dos componentes do transporte de eletrões e do complexo citocromo-b6-f. No arroz, a alteração da subunidade do PSI consoante a deficiência do Fe é verificada pelo núcleo do PSI e pelas proteínas do LHC1, como a LHCA1 e LHCA4 [143].

O Fe, na fotossíntese, é um constituinte dos sistemas enzimáticos. No entanto, também atua no desenvolvimento de certas enzimas, como a catalase e peroxidase, e em meios metabólicos como a redução de nitrato e sulfato e a fixação simbiótica do nitrogénio. Além disso, o Fe é descrito como um fator restritivo para a formação de biomassa e de sementes de espécies como *Arabidopsis* e arroz [144-147].

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Caracterizar fisiológica e molecularmente plantas de arroz mutantes no gene *FRD-like* (locus Os12g0106600, um membro da família MATE) em relação à sua função na absorção e transporte de Fe e na tolerância à toxicidade por Al.

3.2 Objetivos específicos

- Caracterizar fisiologicamente (concentração de clorofila, comprimento da raiz, altura da planta, peso seco da raiz e da parte aérea) a resposta das plantas mutantes e selvagens à deficiência de Fe e excesso de Al;
- Confirmar a baixa ou nula expressão do gene *FRD-like* em plantas mutantes (*frd-like*) submetidas aos diferentes tratamentos;
- Verificar a expressão tecidual e temporal do gene *FRD-like* em plantas de arroz desenvolvidas em condições controle, deficiência de Fe e excesso de Al.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos da presente Dissertação de Mestrado foram realizados na Universidade do Vale do Taquari – Univates, localizada na cidade de Lajeado, estado Rio Grande do Sul, Brasil. O estudo foi conduzido num período de 6 meses, de outubro de 2019 até março de 2020.

A pandemia de Covid-19 que atualmente o mundo enfrenta provocou uma limitação no acesso aos Laboratórios da Univates, e antecipou o meu retorno a Portugal, o que infelizmente impediu a realização de grande parte dos experimentos programados.

4.1 Material Vegetal

Foram selecionadas 200 sementes de *Oryza sativa ssp. japonica cv. Nipponbare* e 200 sementes de uma variedade mutante no gene *FRD-like* (locus Os12g0106600).

4.2 Crescimento hidropónico

As sementes foram germinadas numa sala de crescimento controlada sob um sistema hidropónico. Estas foram submetidas a uma solução de limpeza composta por: 24,5 mL de água destilada, 1 mL de detergente neutro e 24,5 mL de hipoclorito de sódio (NaClO) – concentração de 2 a 3%. As sementes foram colocadas num recipiente e submetidas à solução de limpeza durante 1 minuto. Seguidamente, retiramos a solução utilizando uma peneira para reter as sementes e lavamos as sementes, 2 a 3 vezes, com água destilada utilizando a pisseta. As sementes ficaram durante 5 minutos num recipiente com água destilada e ao fim deste tempo despejamos o conteúdo, retendo as sementes na peneira e voltamos a lavar com o auxílio da pisseta. Este processo é repetido 4 vezes.

Por fim, as sementes foram cultivadas num sistema montado com caixas de ponteiras com solução controlo para germinarem, durante 20 dias (Figura 2).



Figura 2 - Sistema hidropônico montando com caixas de ponteiras

Posteriormente, as plantas foram submetidas às diferentes condições: controle (solução nutritiva), excesso de Al (solução nutritiva mais $450 \mu\text{M AlCl}_3$) e deficiência de Fe (solução nutritiva com $0 \mu\text{M Fe-EDTA}$) (Figuras 3 e 4).

A solução nutritiva continha macro e micronutrientes essenciais à planta que contribuíssem para o seu crescimento e desenvolvimento.

Assim, em reservatórios de 5L, a solução era constituída por 5 mL de cada macronutriente, dos quais cloreto de potássio ($0,1 \text{ mM KCl}$), fosfato de potássio ($0,1 \text{ mM KH}_2\text{PO}_4$), nitrato de cálcio ($2 \text{ mM Ca}(\text{NO}_3)_2$), sulfato de magnésio ($0,5 \text{ mM MgSO}_4$), sulfato de potássio ($1,4 \text{ mM K}_2\text{SO}_4$). Além disso, era adicionado 5 mL de micronutrientes, constituídos por sulfato de zinco ($0,5 \mu\text{M ZnSO}_4$) ácido bórico ($10 \mu\text{M H}_3\text{BO}_3$), sulfato de cobre ($0,2 \mu\text{M CuSO}_4$), molibdato de amônio ($0,01 \mu\text{M } (\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$), sulfato de manganês ($0,5 \mu\text{M MnSO}_4$). Por fim, adicionava-se 20 mL de Fe-EDTA ($0,1 \text{ mM}$) e perfazia-se com água destilada.

A solução nutritiva foi renovada a cada três dias e o pH monitorizou-se e regulou-se para 4,5 sempre que necessário, com a adição de NaOH ou HCl.



Figura 3 - Plantas selvagens nos diferentes meios



Figura 4 - Plantas mutantes nos diferentes meios

4.3 Caracterização fisiológica

Após 14, 21 e 28 dias de exposição aos diferentes tratamentos (controlo, deficiência de Fe, e excesso de Al) foram recolhidas 5 plantas das duas linhagens de forma a analisar os seguintes parâmetros: altura da planta, comprimento da raiz, peso seco da raiz e peso seco da parte aérea.

Após a recolha, foram registadas a altura das plantas e o comprimento das raízes. Seguidamente, foram colocadas numa estufa de ventilação a 70°C durante 8 dias. A matéria seca foi determinada através de uma balança de precisão.

Os níveis de clorofila total foram quantificados de acordo com o método de Ross [148]. As amostras de folhas (cerca de 100 mg) foram inicialmente pulverizadas com nitrogénio líquido. Seguidamente, foram centrifugadas a 12.000 rpm por 6 min. Todos os procedimentos foram realizados com a mínima exposição à luz e no menor tempo possível. Os sobrenadantes foram analisados no espectrofotómetro Genesys 10S UV-Vis, contra um branco com acetona a 85%, medindo absorvâncias em 663 e 645 nm.

A quantidade de clorofila *a* e *b* e clorofila total foi calculada por meio de absorvâncias específicas e equações expressas em g/L.

$$\text{Clorofila } a = (0,0127 * \text{Abs}_{663\text{nm}}) - (0,00269 * A_{645\text{nm}})$$

$$\text{Clorofila } b = (0,0229 * A_{645\text{nm}}) - (0,00468 * A_{663\text{nm}})$$

$$\text{Clorofilas totais} = (0,0202 * A_{645\text{nm}}) + (0,00802 * A_{663\text{nm}})$$

4.4 Recolha do material para análises de expressão genética por RT – qPCR

Após 14, 21 e 28 dias de tratamento foram recolhidas raízes da selvagem e da mutante, as quais foram instantaneamente congeladas com azoto líquido e armazenadas no ultra congelador a - 80°C para posterior análise.

Cada amostra foi formada por três plantas de cada linhagem para cada tratamento em 3 repetições biológicas e 4 repetições técnicas.

Os procedimentos foram executados pela sequência que se segue:

4.4.1 Extração de RNA

O método utilizado de extração de RNA total pelo reagente Trizol® (Invitrogen) seguiu as referências do fabricante.

Inicialmente, adiciona-se 1 mL de Trizol® em cada tubo eppendorf com os fragmentos do tecido. De seguida, de forma a fragmentar o tecido até à dissolução do mesmo, agita-se no vortex seguido de 5 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, adiciona-se 0,2 mL de Clorofórmio, agita-se no vortex por 15 segundos e mantém-se por 3 minutos à temperatura ambiente. As amostras são, seguidamente, centrifugadas a 12000 rpm por 15 minutos a 4°C de forma a separar a fase aquosa da fase da fase que contém os restos da membrana celular. E pipeta-se a fase aquosa (sobrenadante com clorofórmio e RNA) para um tubo limpo, devidamente identificado.

De seguida, adiciona-se 0,5 mL de Isopropanol (álcool isopropílico) e inverte-se os tubos e deixa-se em repouso durante 10 minutos à temperatura ambiente. Repete-se o passo da centrifugação e descarta-se o sobrenadante de forma a manter o pellet intacto. Adiciona-se 1 mL de etanol 75% gelado na parede do eppendorf e centrifuga-se a 8000 rpm por 10 minutos a 4°C. Volta-se a descartar o sobrenadante e seca-se o pelle, virando os tubos ao contrário, para remover o excesso de álcool de forma a este não interferir na leitura. Por fim, ressuspende-se o pellet com água Milli-Q (30 µl para as raízes e 40-45 µl para a folha), e de forma a este desmanchar usa-se o vortex seguido de um spin. As amostras extraídas são guardadas a -20°C.

4.4.2 Quantificação de RNA utilizando o Qubit

A quantificação de RNA realizou-se utilizando o Qubit® RNA Assay Kit e o equipamento Qubit® 2.0 Fluorometer®. Neste procedimento, utiliza-se um fluoróforo que se liga especificamente às fitas de RNA e um fluorímetro que quantifica a intensidade de fluorescência presente em cada amostra, que é diretamente proporcional à concentração de RNA da amostra.

Em primeiro lugar, as amostras de RNA são diluídas 20 vezes (1 µL do RNA total + 19 µL de água Milli-Q). Seguidamente, prepara-se a solução de trabalho (Working Solution - WS) que é utilizada na calibração e na quantificação. Para cada amostra: 199 µL tampão + 1 µL fluoróforo. Para a calibração, prepara-se os padrões: Standard 1: 190 µL WS + 10µL Standard 1 e Standard 2: 190 µL WS + 10µL Standard 2. Para a preparação de cada amostra utiliza-se 199 µL WS + 1 µL RNA (diluído 20X). Por fim, agita-se por 5 segundos no vortéx e após calibrar o equipamento, quantifica-se cada uma das amostras de RNA.

4.4.3 Síntese do cDNA

Neste procedimento, utilizou-se a enzima M-MLV (Moloney Murine Leukemia Virus) que sintetiza uma fita de DNA complementar à fita de RNA designada cDNA. A conversão do RNA em cDNA é exequível uma vez que se utiliza um primer oligo (dT) que se liga à cauda poliA dos mRNAs, concedendo a análise da expressão de genes específicos numa amostra biológica.

Inicialmente calcula-se a quantidade de RNA mais H₂O necessária para prefazer, neste caso, 8 µL. Seguidamente, pipeta-se para cada tubo 1 µL de 10x DNase I Reaction Buffer mais 1 µL de DNase Turbo e coloca-se no termociclador a 37°C durante 30 minutos. Adiciona-se 1 µL de EDTA 25 mM e volta-se ao termociclador a 70°C durante 10 min. Depois, adiciona-se 1 µL de CDS e 1 µL dNTPs Mix 10 mM e volta ao termociclador a 65°C durante 5 minutos. Após se retirar do termociclador coloca-se no gelo, adiciona-se 4 µL 5X First-Strand Buffer e 2 µL DTT 0,1 M e retorna ao termociclador a 37°C durante 2 minutos. Por fim, adiciona-se 1 µL M-MLV (200 U/ µl) e coloca-se no termociclador a 37°C durante 50 minutos, finalizando a 70°C durante 15 minutos. As amostras são guardadas a -20°C.

4.4.4. Análise da expressão genética através de RT-qPCR

O PCR em Tempo Real (RT-qPCR) é utilizado para analisar a expressão de genes específicos de maneira precisa e altamente reprodutível, por meio de um mecanismo de detecção e quantificação por fluorescência.

Para reação de RT-qPCR de 4 genes (3 genes testes + 1 gene controle) utilizou-se um volume de 20µl (10µl de cDNA + 10µl da solução mix). A solução mix para os 48 poços é composta por: 198,8 µl H₂O Milli-Q, 106 µl de tampão de PCR 10X, 103,6 µl de MgCl₂ 50mM, 10,8 µl dNTPs 10mM, 21,2 µl de primer F, 21,2 µl de primer R, 106 µl de SYBR Green® diluído e 2,8 µl de Platinum Taq DNA polimerase.

Seguidamente, distribui-se 10 µl da solução mix em cada um dos 48 poços e após dividir a placa em 4 partes iguais distribui-se 10 µl de cDNA de cada amostra por cada respectivo quarto da placa. Cada parte de cada gene deve ter um poço branco que será o controle onde se adiciona 10 µl de H₂O.

A reação foi realizada com o uso do aparelho StepOne Real-Time PCR Systems (AppliedBiosystems, Foster City, CA, USA), e os dados obtidos foram quantificados de acordo com o método de Livak e Schmittgen e a eficiência da PCR foi analisada conforme descrito por Ricachenevsky et al [149-150].

Os valores de Ct de todos os genes foram regularizados para o valor Ct da *UBQ5* [151].

4.5 Análise estatística

Para a análise dos resultados teve-se em consideração um estudo pelo teste *t* de Student ($p < 0.05$, 0.01 e 0.001) de forma a analisar as plantas da linhagem selvagem (cv. Nipponbare) e o mutante em cada condição, permitindo comparar as duas linhagens entre si, usando o software SPSS 23.0.

5. RESULTADOS

5.1 Variáveis de crescimento

Ao longo de 14, 21 e 28 dias foram medidos os parâmetros de crescimento, como a altura da parte aérea, comprimento da raiz, e peso seco da parte aérea e da raiz.

Quando analisamos a altura da parte aérea verificamos que as plantas da linhagem selvagem (cv. Nipponbare) apresentaram uma diferença significativa nos diferentes tratamentos quando comparadas às plantas do tipo mutante. Estas apresentaram sempre valores superiores, no meio controlo e excesso de Al, tornando-se cada vez mais significativas ao longo dos 28 dias. No entanto, no meio sem Fe, verificou-se um oscilamento durante os 28 dias, constatando-se inclusive uma diferença não significativa no último tempo (Figura 5).

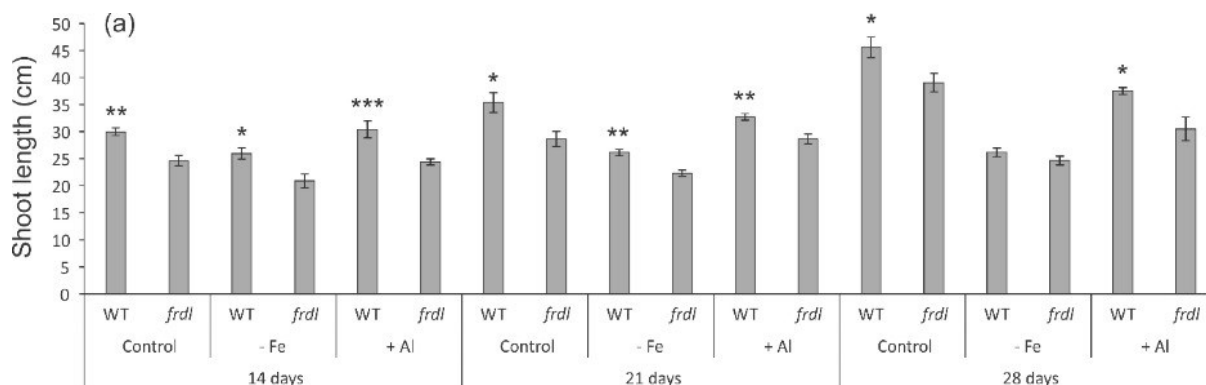


Figura 5 – Altura da parte aérea de *Oryza sativa ssp. japonica* cv. Nipponbare e da variedade mutante submetidas ao controlo, à deficiência de Fe e à toxidez por Al por um período de 14, 21 e 28 dias.

Quando analisamos o comprimento da raiz, nos três tempos, não verificamos diferenças significativas entre as plantas da linhagem selvagem (cv. Nipponbare) e as plantas do tipo mutante no meio controlo e com excesso de Al. No entanto, o meio sem Fe mostrou que as plantas do tipo mutante apresentavam diferenças significativamente superiores quando comparadas com as selvagens. Esta diferença aumentou gradualmente ao longo dos 28 dias ($p < 0.001$) (Figura 6).

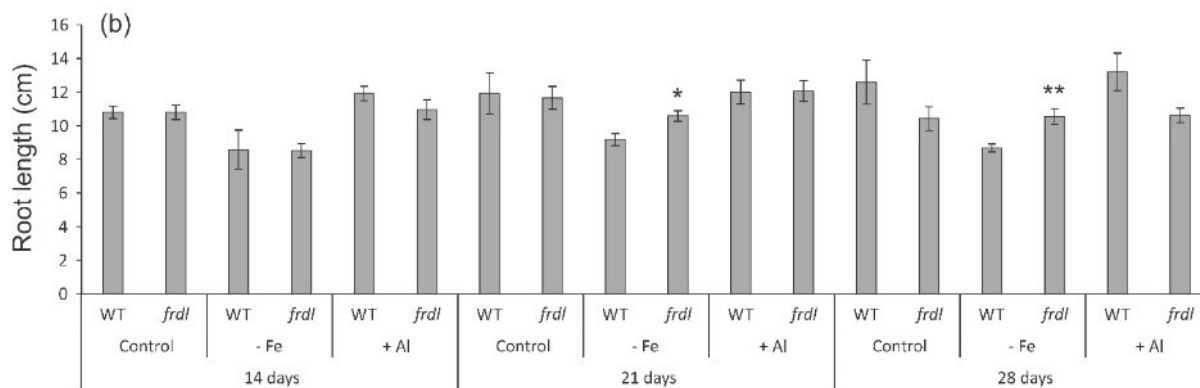


Figura 6 - Comprimento da raiz de *Oryza sativa ssp. japonica* cv. Nipponbare e da variedade mutante submetidas ao controlo, à deficiência de Fe e à toxidez por Al por um período de 14, 21 e 28 dias.

Quando se avaliou a matéria seca da parte aérea das plantas verificou-se uma diferença significativamente maior quando cultivadas na solução controlo e excesso de Al. A diferença no meio controlo foi aumentando gradualmente ao longo dos 28 dias para um nível de significância de $p < 0.001$, enquanto que a diferença no meio com excesso de Al oscilou durante os três tempos, tornando-se menos significativa aos 28 dias ($p < 0.05$), quando comparada com os primeiros 14 dias.

No meio sem Fe não verificamos diferenças ao longo dos 28 dias, sendo que o peso seco da parte aérea das plantas selvagens manteve-se relativamente semelhante ao da linhagem mutante (Figura 7).

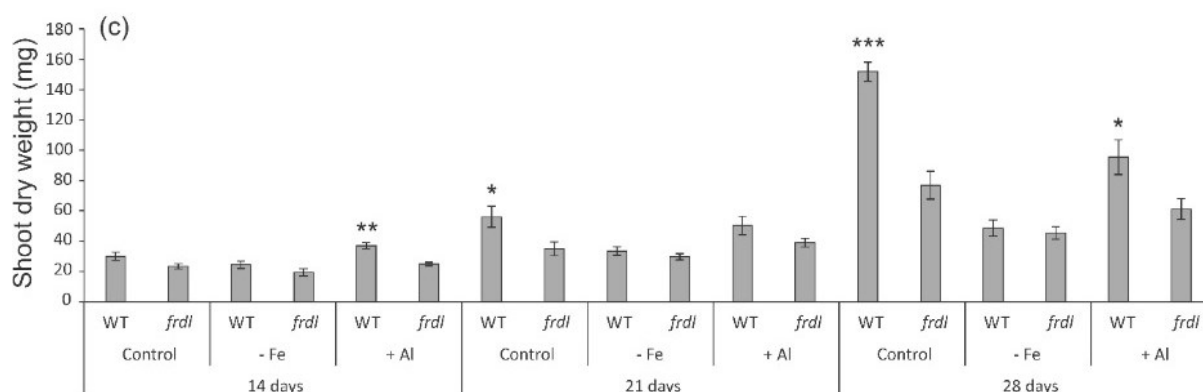


Figura 7 – Matéria seca da parte aérea de *Oryza sativa ssp. japonica* cv. Nipponbare e da variedade mutante submetidas ao controlo, à deficiência de Fe e à toxidez por Al por um período de 14, 21 e 28 dias.

A matéria seca das raízes no meio controlo demonstrou uma diferença significativamente maior ao fim dos 28 dias ($p < 0.001$) nas plantas selvagens quando comparadas à linhagem mutante.

No meio sem Fe apenas foi possível verificar diferenças entre as plantas ao fim de 28 dias, quando as raízes das plantas selvagens demonstraram ser significativamente mais pesadas ($p < 0.05$).

No meio com excesso de Al, verificamos uma diferença significativamente maior ($p < 0.01$) nas plantas selvagens, ao fim de 14 dias, no entanto esta diferença não foi notável nos outros 2 tempos (14 e 28 dias) (Figura 8).

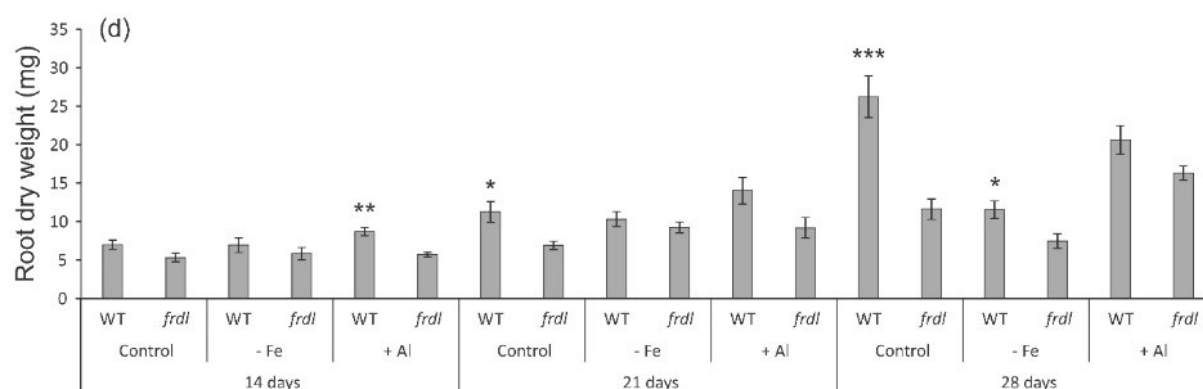


Figura 8 – Matéria seca da raiz de *Oryza sativa ssp. japonica* cv. Nipponbare e da variedade mutante submetidas ao controlo, à deficiência de Fe e à toxidez por Al por um período de 14, 21 e 28 dias.

5.2 Pigmentos fotossintéticos

Nos pigmentos fotossintéticos, clorofila total (a+b), não se observou grandes diferenças entre as plantas do tipo selvagem e a linhagem mutante *FRD-like*, quando cultivadas em solução controlo, déficit de Fe ou excesso de Al. No entanto, as plantas selvagens destacaram-se, no fim dos tratamentos, no meio controlo, verificando-se uma diferença significativa ($p > 0,05$) em relação às plantas mutantes (Figura 9).

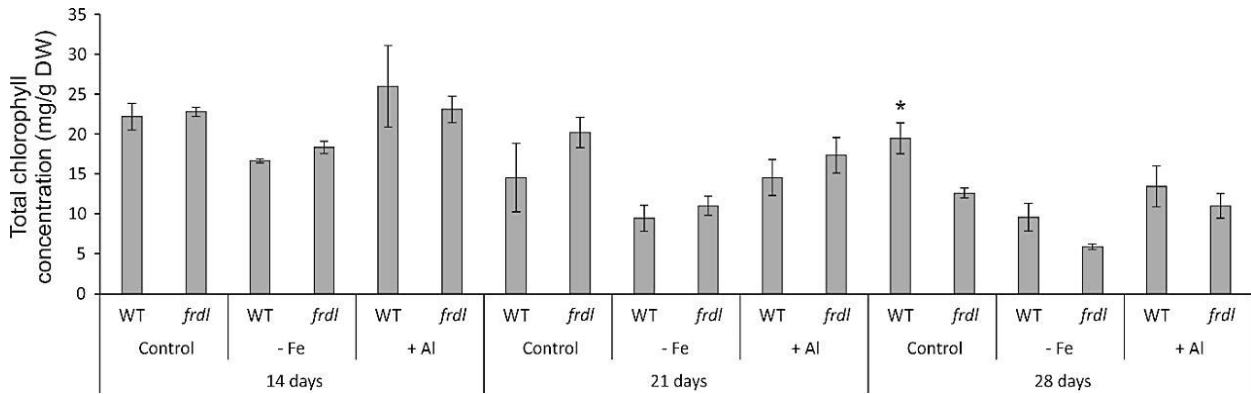


Figura 9 - Concentração de clorofila total em folhas de plantas de *Oryza sativa ssp. japonica* cv. Nipponbare e variedade mutante submetidas ao controle, à deficiência de Fe e à toxidez por Al por um período de 14, 21 e 28 dias.

5.3. Análise da expressão genética

Iniciou-se a quantificação por RT-qPCR da expressão relativa dos genes transportadores de Fe, *YSL15*, *IRT1* e *NRAMP1*, nas raízes de plantas da linhagem selvagem e mutante sob a condição controle e deficiência de Fe.

Para verificar a expressão de transportadores de Al nas raízes das plantas iríamos testar os genes *ALMT 04g3010*, *ALMT 04g47130*, *ART1*, *ASR1*, *ASR5*, *FRDL4*, *NAC5*, *STAR1* sob a condição controle e excesso de Al.

No entanto, devido à pandemia do Covid-19, não foi possível obter resultados, uma vez que não se analisou todos os diferentes genes nos diferentes tratamentos e tempos de exposição.

6. DISCUSSÃO

O arroz pertence à classe dos cereais mais cultivados e consumidos no mundo. O rendimento da cultura de arroz está limitado por diversos stresses bióticos e abióticos, como condições climáticas e ambientais, devido ao facto de esta estar amplamente distribuído em todos os continentes (exceto na Antártida). Entre os diferentes problemas do solo estão a deficiência e/ou toxicidade de micro e/ou macronutrientes, como o Fe e o Al.

O arroz é o cereal cultivado mais tolerante ao excesso de Al [152]. A capacidade de tolerância do arroz a níveis elevados de Al em comparação ao milho, trigo e sorgo foi divulgada por Famoso et al [153].

Os principais sintomas da toxicidade de Al verificado nas plantas são a inibição do crescimento das raízes, a deposição de calosidade no ápice das raízes, simultaneamente com irregularidades celulares [154-155]. As reduções no crescimento das raízes devem-se à redução do alongamento e divisão celular, o que promove a ineficácia na absorção de água e outros nutrientes. O principal local de toxicidade de Al são as pontas das raízes, o que indica, que muitos genes de tolerância ao Al são bastante expressos nesta zona [156-157].

Ao contrário do que era suposto obter, os nossos resultados não demonstraram uma redução significativa nos parâmetros analisados nas raízes das plantas cultivadas no meio com excesso de Al (Figura 6). No entanto, estas alterações nos sintomas podem dever-se a diferenças na idade das plantas, a diferenças genéticas nos génotipos, à concentração e duração da exposição de Al e à metodologia aplicada [158].

O citrato, transportado por membros da família MATE, pode ter duas funções diferentes nas plantas: translocação de Fe das raízes para os brotos e desintoxicação de Al nas raízes [159]. As espécies de plantas e as mudanças na expressão espacial durante a domesticação de certas cultivares permitem que certos membros desempenhem a mesma função.

Em plantas gramíneas existe três ramos diferentes, integrando dois MATEs idênticos a FRDL1, extremamente preservado para translocação de Fe, e MATEs idênticos a FRDL2, para a desintoxicação de Al no arroz, centeio, milho, entre outros [160-161]. O terceiro ramo integra apenas dois membros, sendo um deles o OsFRDL4 em arroz, que são responsáveis pela secreção de citrato induzido por Al [161].

Assim sendo, denota-se que no arroz as funções dos genes *OsFRDL2* e *OsFRDL4* são mais diversificadas entre si quando equiparadas com outras plantas sem MATEs idênticos a FRDL4 [159].

Há estudos que demonstram que o *OsFRDL1* e *OsFRDL4*, homólogos de *OsFRDL2*, estão implicados na translocação de Fe e na secreção de citrato dependente de Al, respetivamente. Em comparação aos homólogos, o *OsFRDL2* está relacionado com a secreção de citrato provocado por Al nas raízes. Isto é sustentado pela demonstração que a expressão de *OsFRDL2* foi regulada positivamente por Al [159]. Verificou-se que a inatividade de *OsFRDL2* não influenciou a tolerância ao Al, o que indica que o *OsFRDL2* tem uma contribuição relativamente pequena na tolerância ao Al [159].

O estudo de Inoue et al. comprovou que três genes *OsFRDL* no arroz são regulados por Fe, e descreveram a localização da expressão dos genes *NAS* do arroz [162-163]. O local de expressão de *OsFRDL1* correspondeu à dos três *OsNAS* e *OsYSL2*, principalmente nas células de companhia de plantas com défice de Fe e em células do periciclo próximas do protoxilema. Sob défice de Fe, Inoue et al. verificaram uma leve expressão de *OsFRDL1* induzida no periciclo e nas células de companhia nas raízes e brotos [162]. Visto que a concentração de NA é elevada nos brotos de plantas de arroz com défice de Fe, o *OsFRDL1* transporta NA e exerce um papel na homeostase de Fe no arroz [164]. O NA, que é concentrado em células do periciclo pelos três *OsNASs*, poder ser exportado, via *OsFRDL1*, para o xilema [162].

Entre as culturas de grãos curtos, a de arroz *japonica*, é das cultivares mais tolerantes ao Al [165]. O facto de o arroz tolerar a toxidez de Al deve-se, principalmente, à exsudação de ácidos orgânicos provocados pelo Al. Famoso et al. demonstraram, num trabalho de mapeamento genético e de análise de QTLs (Quantitative Trait Loci), a existência de três regiões implicadas na resistência ao Al que, provavelmente, correspondem aos genes *ART1*, *STAR2* e *Nrat1* [152]. O ART1 é um fator de transcrição que regula a expressão de 32 genes, sendo que alguns estão envolvidos com a resistência ao Al, entre eles o *Nrat1*, que codifica uma proteína localizada na membrana plasmática, que transporta Al para as células das raízes [166-169]. O complexo STAR1/STAR2 desempenha um papel de transportador do género ATP-binding cassette (ABC), que é essencial para a detoxificação de Al nas plantas de arroz [95][97]. No entanto, a tolerância ao Al varia conforme a contribuição de cada gene [159].

Estudos como o de Famoso et al. demonstram que, quando comparado à solução controlo, uma concentração de 150 μM de Al não gera diminuições nas propriedades de crescimento (comprimento do tecido radicular e área projetada, altura do colmo) enquanto uma concentração de 300 μM reduz as características [152]. A formação de EROs é induzida pelo Al, e o H_2O_2 adapta-se como uma molécula sinalizadora de forma a ativar os

mecanismos de defesa de tolerância [170-171]. No entanto, em elevadas concentrações pode provocar irregularidades oxidativas e influenciar o metabolismo celular [87-88][170].

Contudo, há a necessidade de desenvolver técnicas que permitam analisar os acontecimentos e determinar, nas membranas plasmáticas das células das raízes, a atividade dos canais porosos de ácidos orgânicos. A planta necessita de se proteger dos efeitos tóxicos, no entanto, para possibilitar o efluxo dos ácidos, há a eventual necessidade do Al se relacionar com outros componentes da membrana plasmática.

Em resposta à deficiência de Fe, as plantas portadoras da mutação *frdl* não apresentam um crescimento da atividade da redutase do quelato de Fe^{3+} , ao contrário dos mutantes *FRDL3*, que manifestam a atividade da redutase tanto com Fe suficiente como com déficit de Fe, em condições de crescimento [172]. Alterações no sistema radicular como a diminuição do comprimento das raízes são desencadeados pela deficiência de Fe [173]. Neste estudo verificamos, nos tecidos da parte aérea, uma diferença significativa entre a linhagem selvagem e o mutante (Figura 5). No entanto, quando analisamos o sistema radicular, esta diferença é notória na linhagem mutante (Figura 6).

Diferentes estudos indicam que o Fe é um elemento que restringe o crescimento e a acumulação de biomassa nas várias espécies [174-176]

A irregularidade nutricional em plantas de arroz induzida pelo Al é um mecanismo ainda inexplorado [60]. Todavia, crê-se que o excesso de Al pode provocar a formação de calose, que pode propiciar anomalias no transporte entre as células [177].

Outros estudos associam um efeito bloqueador do Al na enzima H^+ -ATPase na membrana plasmática à diminuição da absorção de Zn e outros nutrientes na presença de Al, influenciando a flexibilidade dos iões [171][178]. A presença do Al pode alterar a estrutura da membrana plasmática e o estado iônico próximo da célula, afetando negativamente a homeostase celular e provocando alterações nos processos de transporte de iões [171].

A produção de EROs em plantas com deficiência de Fe é considerada por Chen et al. como uma explicação que compreende a regulação de mecanismos de tolerância a este déficit [179].

As plantas têm processos dependentes de Fe, o que afeta negativamente diversos processos fotossintéticos, como a respiração e a cadeia de transporte de elétrons [106][180]. De forma a aumentar o efeito da absorção, distribuição e utilização de Fe, as plantas adaptam o metabolismo às circunstâncias do meio [181].

O fenótipo de déficit de Fe é semelhante ao da toxicidade de cobre (Cu), ambos apresentam clorose nas folhas e diminuição nos pigmentos fotossintéticos [182]. Neste

trabalho conseguimos visualizar, ao fim de 28 dias de tratamento, clorose nas folhas das plantas com deficiência de Fe.

Segundo Liu et al., em plantas de arroz, diversos parâmetros fotossintéticos são influenciados pela concentração de Fe solúvel. Além disso, verificaram uma diminuição drástica no nível de clorofilas totais em plantas de arroz com déficit de Fe [182].

Quando nos referimos à concentração de clorofila não obtivemos resultados nos meios sem Fe e com toxicidade de Al, ao contrário dos autores Nhan e Hai que constataram um acréscimo do teor de clorofilas a e b e carotenoides em plantações de arroz sujeitas a 500 μM de Al por 8 dias [183].

Os resultados deste trabalho não demonstram diferenças significativas, no entanto, pode dever-se a erros durante o procedimento de trabalho, como contaminações do material utilizado, demora no procedimento, metodologia do trabalho, entre outros. (Figura 9)

7. CONCLUSÃO

Os nossos dados permitem verificar diferenças entre as plantas de arroz selvagem e as plantas de arroz mutantes, principalmente na parte aérea, quando sujeitas ao meio controle, meio com déficit de Fe e ao meio com toxicidade de Al.

No entanto, especula-se que os resultados obtidos neste projeto não sejam fiáveis uma vez que as diferenças visíveis a olho nu, como a clorose nas plantas com déficit de Fe, só foram visíveis ao fim de 28 dias. Presume-se que contaminações no material de trabalho ou falhas na prática do procedimento possam ter influenciado os resultados.

A repetição desta experiência na Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) estava a permitir obter resultados mais significativos, mas devido à pandemia de Covid-19 que o mundo enfrenta, não foi possível finalizar o projeto e obter grande parte dos resultados que eram esperados.

Nos últimos anos, houve um progresso na identificação dos genes responsáveis pela absorção e transporte de Al e Fe no arroz. No entanto, seria relevante um estudo mais aprofundado das bases moleculares da absorção, do transporte, da homeostase e da acumulação destes nutrientes, sucessivamente, com a aplicação, de forma a potencializar o aumento da produtividade das culturas e a biofortificação dos nutrientes. Assim, seria notável concluir este estudo e investigar mais a relação entre os genes *MATE* e a adaptação de plantas de arroz aos diversos stresses abióticos e bióticos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] FAO. 2020. *Food Outlook – Biannual Report on Global Food Markets: June 2020*. Food Outlook, 1. Rome
- [2] INE. Main crops yield (kg/ha) by geographic localization (agrarian region) and specie. Annual; In Instituto Nacional de Estatística, I.P; INE: Mexico City, Mexico, 2019.
- [3] USDA. Portuguese Rice Imports Pick up as Production Declines—USDA Gain Report; USDA: Washington, DC, USA, 2017; p. 13.
- [4] IRGA – Instituto Rio Grandense do Arroz. Boletim de resultados da lavoura - safra 2018/19 – arroz irrigado e soja em rotação. 2019
- [5] Oka. H.I. Origin of Cultivated Rice. Elsevier, Amsterdam, 1988.
- [6] Cheng, C. et al. Polyphyletic origin of cultivated rice: Based on the interspersed pattern of SINEs. *Molecular Biology and Evolution*, v. 20, p. 67–75, 2003
- [7] Almeida, D. M.; Almadanim, M. C.; Lourenço, T.; Abreu, I. A.; Saibo, N. J. M.; Oliveira, M. M. Screening for Abiotic Stress Tolerance in Rice: Salt, Cold, and Drought. *Environmental Responses in Plants: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, v. 1398, 2016
- [8] Rahman, M.; Ijaz, M.; Qamar, S.; Bukhari, S. A.; Malik, K. Advances in Rice Research for Abiotic Stress Tolerance. Elsevier, p. 299-312, 2019.
- [9] INE. Main crops yield (kg/ha) by geographic localization (agrarian region) and specie. Annual; In Instituto Nacional de Estatística, I.P; INE: Mexico City, Mexico, 2019.
- [10] Schmitt, M.; Watanabe, T.; Jansen, S. The effects of aluminium on plant growth in a temperate and deciduous aluminium accumulating species. *AoB Plants*, v. 8, 2016.
- [11] Yamamoto, Y. Aluminum toxicity in plant cells: Mechanisms of cell death and inhibition of cell elongation. *Soil Science and Plant Nutrition*, v. 65, 2019.
- [12] OMS- Organização Mundial da Saúde- (2016). Anemia por deficiência de ferro. Disponível em: <http://www.who.int/nutrition/topics/ida/en/>
- [13] McDermid, J.M., Lönnnerdal, B. (2012) Iron. *Adv Nutr* 3: 532-533.

- [14] Yvonne, L., Slamet-Loedin, I.H. Genetic Biofortification to Enrich Rice and Wheat Grain Iron: From Genes to Product. *Frontiers in Plant Science*, v10, 2019
- [15] Doebley, J.F., Gaut BS, Smith BD (2006) The molecular genetics of crop domestication. *Cell* 127:1309–1321. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.12.006>
- [16] Fuller, D.Q. (2007) Contrasting patterns in crop domestication and domestication rates: recent archaeobotanical insights from the Old World. *Ann Bot* 100:903–924
- [17] Khush, G.S., Origin, dispersal, cultivation and variation of rice. *Plant Mol Biol*.1997. 35(1-2): p. 25-34
- [18] Kennedy, G. and B. Burlingame, Analysis of food composition data on rice from a plant genetic resources perspective. *Food Chemistry*.2003. 80(4): p. 589-596.
- [19] Kasai, M., et al., Quantitative NMR imaging study of the cooking of Japonica and Indica rice. *Food Research International*.2007. 40(8): p. 1020-1029.
- [20] Vaughan, D.A., B.-R. Lu, and N. Tomooka, The evolving story of rice evolution. *Plant science*.2008. 174(4): p. 394-408.
- [21] Juliano, B.O., Rice in human nutrition. International Rice Research Institute.1993
- [22] Conab. Acompanhamento de safra brasileira grãos, v. 4 Safra 2016/17 - Sexto levantamento, Brasília, p. 1-176 março 2017.
- [23] Instituto CEPA/EPAGRI: Síntese Anual da Agricultura de Santa Catarina. v. 31. p. 82-97. Florianópolis, 2010.
- [24] Caldeira, C., 2017. Importações de arroz aumentam com falta de água e forte concorrência estrangeira. [online] *Agricultura e Mar Actual*. Disponível em: <<https://agriculturaemar.com/importacoes-arroz-aumentam-falta-agua-forte-concorrencia-estrangeira/>> [Acesso: 15 Fevereiro de 2021].
- [25] Khush, G. S. What it will take to Feed 5.0 Billion Rice consumers in 2030. *Plant Molecular Biology*, v. 59, p. 1-6, 2005
- [26] Storck, C.R.; Silva, L.P.; Comarella, C.G. (2005). Influência do processamento na composição nutricional de grãos de arroz. *Alim. Nutr., Araraquara* v.16, n.3, p. 259-264, jul./set.

- [27] Kennedy, G. et al. (2002) Nutrient impact assessment of rice in major rice- consuming countries. *International Rice Commission Newsletter*, v.51, p.33-42.
- [28] Castro, E.M.; Vieira, N.R.A.; Rabelo, R.R.; Silva, S.A. (1999) Qualidade de grãos em arroz. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 30p. (Embrapa Arroz e Feijão. Circular Técnica, 34).
- [29] Bassinelo, P.Z. (2006) Aproveitamento industrial. In: Santos, A.B.; Stone, L.F.; Vieira, N.R.A. *A cultura do arroz no Brasil*. 2. Ed. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2006. Cap. 24, p. 1007-1042
- [30] Miller, J.B. et al. Rice: a high or low glycemic index food? *American Journal of Clinical Nutrition*, v.56, p.1034- 1036, 1992.
- [31] Koide, T. et al. Antitumor effect of hydrolyzed anthocyanin from grape rinds and red rice. *Cancer Biotherapy and Radiopharmacology*, v.11, n.4, p.273-277, 1996.
- [32] Qureshi, A.A. et al. Novel tocotrienols of rice bran modulate cardiovascular disease risk parameters of hypercholesterolemic humans. *Nutritional Biochemistry*, v.8, p.290-298, 1997.
- [33] Rong, N. et al. Oryzanol decreases cholesterol absorption and aortic fatty streaks in hamsters. *Lipids*, v.32, n.3, p.303-309, 1997.
- [34] Xia, M. et al. Supplementation of diets with the black rice pigment fraction attenuates atherosclerotic plaque formation in apolipoprotein E deficient mice. *Journal of Nutrition*, v.133, n.3, p.744-751, 2003.
- [35] White, P.J., Broadley, M.R. Biofortification of crops with seven mineral elements often lacking in human diets – iron, zinc, copper, calcium, magnesium, selenium and iodine. *New Phytol* 182: 49-84, 2009.
- [36] Hvorup, R.N., Winnen, B., Chang, A. B., Jiang, Y., Zhou, X., Saier JR, M.H. The multidrug/oligosaccharidyl-lipid/polysaccharide (MOP) exporter superfamily. *European Journal of Biochemistry*, v. 270, p.799-813, 2003.
- [37] Takanashi, K., Shitan, N., Yaaki, K. The multidrug and toxic compound extrusion (MATE) family in plants. *Plant Biotechnology*, v. 31, n. 5, p. 417-430, 2014.

- [38] He, X., Szewczyk, P., Karyakin, A., Evin, M., Hong, W.X., Zhang, Q., Chang, G.: Structure of a cation-bound multidrug and toxic compound extrusion transporter. - *Nature* 467: 991- 994, 2010
- [39] Shoji, T. ATP-binding cassette and multidrug and toxic compound extrusion transporters in plants: a common theme among diverse detoxification mechanisms. - *Int. Rev. cell. mol. Biol.* 309: 303-346, 2014
- [40] Takanashi, K., Shitan, N., Yazaki, K.: The multidrug and toxic compound extrusion (MATE) family in plants. - *Plant. Biotechnol.* 31: 417-430, 2014.
- [41] Yazaki, K. Transporters of secondary metabolites. *Curr. Opin. Plant Biol.* 8: 301–307, 2005
- [42] Yokosho, K., Yamaji, N., Ueno, D., Mitani, N. and Ma, J.F. OsFRDL1 is a citrate transporter required for efficient translocation of iron in rice. *Plant Physiol.* 149: 297–305, 2009
- [43] Tiwari M., Sharma D., Singh M., Tripathi R.D., Trivedi P.K.: Expression of OsMATE1 and OsMATE2 alters development, stress responses and pathogen susceptibility in Arabidopsis. *SCI REP-UK* 4(2):3964, 2014
- [44] Kuroda T., Tsuchiya T. Multidrug eux transporters in the MATE family. *Biochim Biophys Acta* 1794(5):763-768, 2009
- [45] Li, N., Meng, H., Xing, H., Liang, L., Zhao, X., Luo, K.: Genome-wide analysis of MATE transporters and molecular characterization of aluminum resistance in *Populus*. - *J. exp. Bot.* 68: 5669-5683, 2017
- [46] Zhu, H., Wu, J., Jiang, Y., Jin, J., Zhou, W., Wang, Y., Han, G., Zhao, Y., Cheng, B.: Genomewide analysis of MATEtype gene family in maize reveals microsynteny and their expression patterns under aluminum treatment. - *J. Genet.* 95: 691-704, 2016.
- [47] Diener, A.C., Gaxiola, R.A., Fink, G.R.: Arabidopsis ALF5, a multidrug efflux transporter gene family member, confers resistance to toxins. - *Plant Cell* 13: 1625-1638, 2001.
- [48] Green, L.S. and Rogers, E.E. (2004) FRD3 controls iron localization in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 136: 2523–2531.

- [49] Durrett, T.P., Gassmann, W. and Rogers, E.E. (2007) The FRD3-mediated efflux of citrate into the root vasculature is necessary for efficient iron translocation. *Plant Physiol.* 144: 197–205.
- [50] Inoue, H., Mizuno, D., Takahashi, M., Nakanishi, H., Mori, S. and Nishizawa, N.K. A rice FRD3-like (OsFRDL1) gene is expressed in the cells involved in long-distance transport. *Soil Sci. Plant Nutr.* 50: 1133–1140, 2004
- [51] Magalhaes, J.V., Liu, J., Guimaraes, C.T., Lana, U.G.P., Alves, V.M.C., Wang, Y.H., et al. A gene in the multidrug and toxic compound extrusion (MATE) family confers aluminum tolerance in sorghum. *Nat. Genet.* 39: 1156–1161, 2007
- [52] Yang, X.Y., Yang, J.L., Zhou, Y., Pinosos, M.A., Kochian, L.V., Li, G.X., et al. A de novo synthesis citrate transporter, *Vigna umbellata* multidrug and toxic compound extrusion, implicates in Al-activated citrate efflux in rice bean (*Vigna umbellata*) root apex. *Plant Cell Environ.* 34: 2138–2148, 2011
- [53] Sawaki, Y., Kihara-Doi, T., Kobayashi, Y., Nishikubo, N., Kawazu, T., Koyama, H., et al. Characterization of Al-responsive citrate excretion and citrate-transporting MATEs in *Eucalyptus camaldulensis*. *Planta* 237: 979–989, 2013
- [54] Wu, X., Li, R., Shi, J., Wang, J., Sun, Q., Zhang, H., et al. Brassica oleracea MATE encodes a citrate transporter, and enhances aluminum tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 55: 1426–1436, 2014
- [55] Furukawa, J., Yamaji, N., Wang, H., Mitani, N., Murata, Y., Sato, K., et al. An aluminum-activated citrate transporter in barley. *Plant Cell Physiol.* 48: 1081–1091, 2007
- [56] Serrano, M., Wang, B., Aryal, B., Abou-Mansour, E., Heck, S., Geisler, M., Mauch, F., Nawrath, C., Métraux, J.P.: Export of salicylic acid from the chloroplast requires the multidrug and toxin extrusion-like transporter EDS5. - *Plant Physiol.* 162: 1815-1821, 2013.
- [57] Yamasaki, K., Motomura, Y., Yagi, Y., Nomura, H., Kikuchi, S., Nakai, M., Shiina, T.: Chloroplast envelope localization of EDS5, an essential factor for salicylic acid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. - *Plant Signal. Behav.* 8: e23603, 2013.
- [58] Yokosho, K., Yamaji, N., Fujii-Kashino, M., Ma, J.F.: Retrotransposon-mediated aluminum tolerance through enhanced expression of the citrate transporter OsFRDL4. - *Plant Physiol.* 172: 2327-2336, 2016.

- [59] Pereira, J.F., Ryan, P.R.: The role of transposable elements in the evolution of aluminium resistance in plants. - *J. exp. Bot.* 70: 41-54, 2019
- [60] Debeaujon, I., Peeters, A.J.M., Leon-Kloosterziel, K.M., Koornneef, M.: The TRANSPARENT TESTA 12 genes of *Arabidopsis* encode a multidrug secondary transporter-like protein required for flavonoid sequestration in vacuoles of the seed coat endothelium. - *Plant Cell* 13: 853-871, 2001.
- [61] Zhao, J., Dixon, R.A.: MATE transporters facilitate vacuolar uptake of epicatechin 3'-O-glucoside for proanthocyanidin biosynthesis in *Medicago truncatula* and *Arabidopsis*. - *Plant Cell*. 21: 2323-2340, 2009.
- [62] Yokosho, K., Yamaji, N. and Ma, J.F. Isolation and characterization of two MATE genes in rye. *Func. Plant Biol.* 37, 296–303, 2010.
- [63] Yokosho K, Yamaji N, Jian FM: An Al-inducible MATE gene is involved in external detoxication of Al in rice. *Plant Journal for Cell & Molecular Biology*, 68(6):1061-1069, 2011.
- [64] Yokosho K, Yamaji N, Fujii-Kashino M, Ma JF. Functional Analysis of a MATE Gene OsFRDL2 Revealed its Involvement in Al-Induced Secretion of Citrate, but a Lower Contribution to Al Tolerance in Rice. *Plant Cell Physiol*, 2016.
- [65] Kochian, L.V. Cellular mechanisms of aluminum toxicity and resistance in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 46:237–260, 1995.
- [66] Kochian, L. V. et al. Plant Adaptation to Acid Soils: The Molecular Basis for Crop Aluminum Resistance. *Annual Review Plant Biology*, v.015, 2015.
- [67] Jones, D.L., Blancaflor, E.B., Kochian, L.V., Gilroy, S. Spatial coordination of aluminium uptake, production of reactive oxygen species, callose production and wall rigidification in maize roots. *Plant Cell Environ* 29: 1309–1318, 2006
- [68] Ismail, A.M.; Heuer, S.; Thomson, M.J.; Wissuwa, M. Genetic and genomic approaches to develop rice germplasm for problem soils. *Plant Mol. Biol.* 65, 547–570, 2007.
- [69] Liu, J.; Luo, X.; Shaff, J.; Liang, C.; Jia, X.; Li, Z.; Magalhaes, J.; Kochian, L.V. A promoter-swap strategy between the *AtALMT* and *AtMATE* genes increased *Arabidopsis* aluminum resistance and improved carbon-use efficiency for aluminum resistance. *Plant J.* 71, 327–337, 2012

- [70] Von Uexkull, H.R., and Mutert, E. Global extent, development and economic impact of acid soils. *Plant Soil*. 171, 1–15, 1995
- [71] Silva, S.; Pinto, G.; Dias, M. C.; Correia, C.M.; Moutinho-pereira, J.; Pintocarnide, O.; Santos, C. Aluminium long-term stress differently affects photosynthesis in rye genotypes. *Plant Physiology Biochemistry*, v. 54, p. 105–112, 2012.
- [72] Kopittke, P. M.; Moore, K. L.; Lombi, E.; Gianoncelli, A.; Ferguson, B. J.; Blamey, F. P.; Menzies, N.W.; Nicholson, T.M.; Mckenna, B.A.; Wang, P.; Gresshoff, P. M. Identification of the primary lesion of toxic aluminum in plant roots. *Plant Physiology*, v. 167, p. 1402-1411, 2015.
- [73] Guo, P.; QI, Y.; Yang, L.; Lai, N.; Ye, X.; Yang, Y.; Chen, L. Root Adaptive Responses to Aluminum-Treatment Revealed by RNA-Seq in Two Citrus Species With Different Aluminum-Tolerance. *Frontiers in Plant Science*, v. 8, 2017
- [74] Alessa, L.; Oliveira, L. Aluminum toxicity studies in *Vaucheria longicaulis* var. *Macounii* (Xanthophyta, Tribophyceae) II. Effects on the F-Actin array. *Environmental and Experimental Botany*, v. 45, p. 223-237, 2001.
- [75] Zhang, J.J., He, Z.H., Tian, H., Zhu, G.H., Peng, X.X. Identification of aluminium-responsive genes in rice cultivars with different aluminium sensitivities. *J Exp Bot* 58: 2269–2278, 2007
- [76] Morimura S, Taakahashi E, Matsumoto H Association of aluminum with nucleic and inhibition of cell division in onion (*Allium opa*) roots. *Z Pflanzenernahr Bodenk* 88:395–401, 1978
- [77] Foy, C.D. Effect of aluminum on plant growth. In: Carson EW (ed) *The plant root and its environment*. University Press of Virginia, Charlottesville, Virginia, pp 601–642, 1974
- [78] Foy, C.D. Effect of nutrient deficiencies and toxicities in plants: acid soil toxicity. Manuscript for handbook of nutrition and food. CRC Press, Boca Raton, Florida, 1982
- [79] Foy, C.D. Effects of soil acidity on plants. Invited contribution to an EPA "Acidic Deposition Critical Assessment Document" prepared under a cooperative agreement between EPA and North Carolina State University, Raleigh, North Carolina, 1982
- [80] Foy, C.D., Chaney, R.L., White, M.C. The physiology of metal toxicity in plants. *Annu Rev Plant Physiol* 29:511–566, 1978

- [81] Campbell, T.A., Jackson, P.R., Xia, Z.L. Effect of aluminum stress on alfalfa root proteins. *Journal of Plant Nutrition*, 17:2-3, 461-471, 1994
- [82] Foy, C.D. The physiology of plant adaptation to mineral stress. *Iowa State J Res* 57:355–391, 1983
- [83] Guo, T.R.; Yao, P.C.; Zhang, Z.D.; Wang, J.J.; Wang, M. Involvement of antioxidative defense system in rice growing seedlings exposed to Aluminum toxicity and Phosphorus deficiency. *Rice Science*, v.19, p. 207-212, 2012
- [84] Kopittke, P. M. Role of phytohormones in aluminium rhizotoxicity. *Plant Cell Environment*, v. 39, p.2319-2328, 2016
- [85] Bose J.; Babourina O.; Rengel Z. Role of magnesium in alleviation of aluminum toxicity in plants. *Journal of Experimental Botany*, v. 62, p. 2251-2264, 2011
- [86] Fleming, A. L.; Foy, C. D. Root structure reflects differential aluminum tolerance in wheat varieties. *Agronomy Journal, Madison*, v. 60, p. 172-176, 1968
- [87] Chowra, U.; Yanase, E., Koyama, H.; Panda, S. K. Aluminium-induced excessive ROS causes cellular damage and metabolic shifts in black gram *Vigna mungo* (L.) Hepper. *Protoplasma*, v. 254, 2017
- [88] Gupta, N.; Gaurav, S. S.; Kumar, A. Molecular basis of aluminium toxicity in plants: A Review. *American Journal of Plant Sciences*, v. 4, p. 21-37, 2013.
- [89] Singh, S.; Tripathi, G. K.; Singh, S.; Sharma, S.; Dubey, N. K.; Chauhan, D. K.; Vaculík, M. Toxicity of aluminium on various levels of plant cells and organism: a review. *Environmental and Experimental Botany*, v. 137, p. 177-193, 2017
- [90] Wang, Y.S., Yang, Z.M. Nitric oxide reduces aluminum toxicity by preventing oxidative stress in the roots of *Cassia tora* L. *Plant Cell Physiol* 46: 1915–1923, 2005
- [91] Schreiber, H.D., Jones, A.H., Lariviere, C.M., Mayhew, K.M., Cain, J.B. (2011) Role of aluminum in red-to-blue color changes in *Hydrangea macrophylla* sepals. *Biometals* 24: 1005–1015
- [92] Degenhardt, J., Larsen, P.B., Howell, S.H., Kochian, L.V. Aluminum resistance in the *Arabidopsis* mutant *atr-104* is caused by an aluminum-induced increase in rhizosphere pH. *Plant Physiol* 117: 19–27, 1998

- [93] Fan, W.; Xu, J. M.; Lou, H. Q.; Xiao, C.; Chen, W. W.; Yang, J. L. Physiological and molecular analysis of aluminum-induced organic acid anion secretion from grain amaranth (*Amaranthus hypochondriacus* L.) roots. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 17, p. 608, 2016.
- [94] Yang, J.; Fan, W.; Zheng, S. Mechanisms and regulation of aluminum-induced secretion of organic acid anions from plant roots. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B (Biomedicine & Biotechnology)*, v. 20, p. 513–527, 2019
- [95] Huang, C.F.; Yamaji, N.; Mitani, N.; Yano, M.; Nagamura, Y.; Ma, J. F. A bacterial-type ABC transporter is involved in aluminum tolerance in rice. *Plant Cell*, v. 21, p. 655–67, 2009
- [96] Ma, J. F.; Nagao, S.; Huang, C. F.; Nishimura, M. Isolation and characterization of a rice mutant hypersensitive to Al. *Plant Cell and Physiology*, v. 46, p. 1054–1061, 2005
- [97] Yokosho, K., Yamaji, N., and Ma, J.F. An Al-inducible MATE gene is involved in external detoxification of Al in rice. *Plant J.* 68, 1061–1069, 2011
- [98] Arenhart, R. A.; Lima, J. C.; Pedron, M.; Carvalho, F. E. L.; Silveira, J. A.; Rosa, S. B.; Caverzan, A.; Andrade, C. M. B.; Schünemann, M.; Margis, R.; Margis-pinheiro, M. Involvement of ASR genes in aluminium tolerance mechanisms in rice. *Plant, Cell & Environment*, v. 36, p. 52–67. 2013.
- [99] Arenhart, R. A.; Margis, R.; Margis-pinheiro, M. A putative role in the response to aluminum photosynthesis disturbance: the rice ASR5 protein. *Plant Signaling and Behavior*, v. 7, p. 1263–1266, 2012.
- [100] Kim, S. J.; Lee, S.; Hong, S. K.; An, K.; AN, G; Kim, S. Ectopic expression of a coldresponsive OsAsr1 cDNA gives enhanced cold tolerance in transgenic rice plants. *Molecules and Cells*, v. 27, p. 449–458, 2009
- [101] Liu, H.-Y.; Dai, J.-R.; Feng, D.-R.; LIU, B.; Wang, H.-B.; and Wang, J.-F. Characterization of a novel plantain Asr gene, MpAsr, that is regulated in response to infection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* and abiotic stresses. *Journal of Integrative Plant Biology*, v. 52, p. 315–323. 2010
- [102] Arenhart, R. A.; Yang, B.; Oliveira, L. F.; Neto, L. B.; Schunemann, M.; Maraschin, F. S.; Margis-pinheiro, M. New insights into aluminum tolerance in rice: the ASR5 protein

binds the STAR1 promoter and other aluminum-responsive genes. *Molecular Plant*, v. 7, p. 709–721, 2014.

[103] Lindsay, W. L. *Chemical equilibria in soils*. New York. John Wiley, p.449. 1979

[104] Filho, M. P. B.; Dynia, J. F.; Fageria N. K. *Zinco e Ferro na cultura do Arroz*. Embrapa – SPI, 1994

[105] Broadley, M.; Brown, P.; Cakmak, I.; Rengel, Z.; Zhao, F. Function of nutrients: micronutrients. In: MARSCHNER, P., ed. *Marschner’s Mineral Nutrition of Higher Plants*, 3.ed. London, Academic Press Elsevier, p. 191-248, 2012

[106] Lucena, J. J.; Hernandez-apaolaza, L. Iron nutrition in plants: an overview. *Plant Soil*, v. 418, p. 1-4, 2017

[107] Movimento, F. *Movimento e sinalização do ferro em plantas com estratégia i*, Universidade do Algarve, 2017

[108] Skikne B., Hershko C. Iron Deficiency. In: Anderson G., McLaren G. (eds) *Iron Physiology and Pathophysiology in Humans*. Nutrition and Health. Humana Press, 2012

[109] Blanco-rojo, R.; Vaquero, M. P. Iron bioavailability from food fortification to precision nutrition. A review. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, v. 51, p. 126-138, 2019

[110] OMS. Documento final de la Segunda Conferencia Internacional sobre Nutrición: Declaracion de Roma sobre la Nutrición. Organización Mundial de la Salud, Roma, 2014

[111] Vasconcelos, M.W., Gruissem, W., Bhullar, N.K. Iron biofortification in the 21st century: setting realistic targets, overcoming obstacles, and new strategies for healthy nutrition. *Current opinion in biotechnology* 44, 8-15, 2017

[112] Zielińska-Dawidziak, M. Plant ferritin—a source of iron to prevent its deficiency. *Nutrients* 7, 1184-1201, 2015

[113] Prentice, A. M.; Mendoza, Y. A.; Pereira, D.; Cerami, C.; Wegmuller, R.; Constable, A.; Spieldenner, J. Dietary strategies for improving iron status: Balancing safety and efficacy. *Nutrition Reviews*, v. 75, p. 49-60, 2017

[114] Curie, C.; Briat, J.F. Iron transport and signaling in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* v.54, p.183–206. 2003.

- [115] George, E. F.; Hall, A. M.; DE Klerk, G-J. *Plant Propagation by Tissue Culture*. 3. ed. Netherlands, 2008. 479p
- [116] Mengel, K.; Kirkby, E.A. *Principles of plant nutrition*. Bern: International Potash Institute, 1987. 687p.
- [117] Marschner. H. *Mineral nutrition of higher plants*. Academic Press, San Diego, USA. 1995.
- [118] Taiz, L., Zeiger, E. *Plant Physiology*. Sinauer Associates, 2a ed.1998.
- [119] SANTOS, L. S. e Costa de oliveira, A. Rice iron metabolism:from source to solution. *Journal of Crop Science and Biotechnology*. v. 10, p. 64-72, 2007
- [120] Larcher. W. *Physiological plant ecology. Ecophysiology and stress physiology of functional groups*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2003. 4a ed
- [121] Sperotto, R.A.; Ricachenevsky, F. K.; Fett, J. P. Iron deficiency in rice shoots: identification of novel induced genes using RDA and possible relation to leaf senescence. *Plant and Cell Reports*. v.26, p.1399-1411.2007.
- [122] Sperotto, R. A.; Boff, T.; Duarte, G. L.; Fett, J. P. Increased senescence- associated gene expression and lipid peroxidation induced by iron deficiency in rice roots. *Plant and Cell Reports*. v.27, p.183-195.2008
- [123] Romheld, V., Marschner, H. Mobilization of iron in the rhizosphere of different plant species. *Advances in plant nutrition (USA)*, 1986
- [124] Robinson, N. J.; Procter, C. M.; Connolly, E.L.; Guerinot, M.L. A ferric-chelate reductase for iron uptake from soils. *Natureza*, v. 397, p. 694-697, 1999
- [125] Eide, D.; Broderius, M.; Fett, J.; Guerinot, M. L. A novel iron-regulated metal transporter from plants identified by functional expression in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 93, p. 5624–28, 1996
- [126] Kobayashi, T.; Nishizawa, N. K. Iron Uptake, Translocation, and Regulation in Higher Plants. *Annu. Rev. Plant Biology*, v. 63, p. 131–52, 2012
- [127] Römheld, V.; Marschner, H. Evidence for a specific uptake system for iron phytosiderophores in roots of grasses. *Plant Physiol*, 80, 175–180, 1986

- [128] Hindt, M.N., Guerinot, M.L. Getting a sense for signals: regulation of the plant iron deficiency response. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research* 1823, 1521- 1530, 2012
- [129] Takagi, S.; Nomoto, K.; Takemoto, T., Physiological aspect of mugineic acid, a possible phytosiderophore of graminaceous plant. *J. Plant Nutr.* v.7, p.469-477, 1984
- [130] Ueno, D.; Rombola, A. D.; Iwashita, T.; Nomoto, K.; MA, J. F. Identification of two new phytosiderophores secreted by perennial grasses. *New Phytologist*, v. 174, p. 304–310, 2007.
- [131] Bashir, K.; Inoue, H.; Nagasaka, S.; Takahashi, M.; Nakanishi, H.; et al. Cloning and characterization of deoxymugineic acid synthase genes from graminaceous plants. *Journal of Biological Chemistry*, v. 43, p. 32395–402, 2006
- [132] Inoue, H.; Kobayashi, T.; Nozoye, T.; Takahashi, M.; Kakei, Y.; et al. Rice OsYSL15 is an iron-regulated iron(III)-deoxymugineic acid transporter expressed in the roots and is essential for iron uptake in early growth of the seedlings. *Journal of Biological Chemistry*, v. 284, p. 3470–79, 2009
- [133] Hell, R. e Stephan, U. W. Iron uptake, trafficking and homeostasis in plants. *Planta*. v.216, p.541-551. 2003.
- [134] Curie, C.; Panaviene, Z.; Loulergue, C.; Dellaporta, S.L.; Briat, J.F.; Walker, E.L. Maize yellow stripe1 encodes a membrane protein directly involved in Fe(III) uptake. *Nature*. v.409, p.346-349. 2001
- [135] Schaaf, G.; Ludewig, U.; Erenoglu, B.E.; Mori, S.; Kitahara, T.; Von Wiren, N. ZmYS1 functions as a proton-coupled Symporter for phytosiderophore- and nicotianamine-chelated metals. *J. Biol. Chem.* v.279, p.9091–9096. 2004
- [136] Schmidt, W. Mechanisms and regulation of reduction based iron uptake in plants. *New Phytology*. v. 141, p.1–26. 1999
- [137] Ishimaru, Y.; Suzuki, M.; Tsukamoto, T.; Suzuki, K.; Nakazono, M. et al. Rice plants take up iron as an Fe³⁺-phytosiderophore and as Fe²⁺. *Plant Journal*, v. 45, p. 335–46, 2006
- [138] Pedas, P.; Ytting, C. K.; Fuglsang, A.T.; Jahn, T. P.; Schjoerring, J.K.; Husted, S. Manganese efficiency in barley: identification and characterization of the metal ion transporter HvIRT1. *Plant Physiology*, v. 148, p. 455–66, 2008

- [139] Calliatte, R.; Schikora, A.; Briat, J. F.; Mari, S.; Curie, C. High-affinity manganese uptake by the metal transporter NRAMP1 is essential for Arabidopsis growth in low manganese conditions. *Plant Cell*, v. 22, p. 904–17, 2010
- [140] Bughio, N.; Yamaguchi, H.; Nishizawa, N. K.; Nakanishi, H. Mori S Cloning an iron regulated metal transporter from rice. *Journal of Experimental Botany*. v.53, p.1677-1682. 2002
- [141] Hell, R.; Stephan, U.W. Iron uptake, trafficking and homeostasis in plants. *Planta*, v. 216, p. 541–51, 2003
- [142] Eberhard, S.; Finazzi, G.; Wollman, F.A. The dynamics of photosynthesis. *Annu. Rev. Genet.*, v. 42, p. 463–515, 2008.
- [143] Yadavalli, V.; Neelam, S.; Rao, A. S.; Reddy, A. R.; Subramanyam, R. Differential degradation of photosystem I subunits under iron deficiency in rice. *Journal of Plant Physiology*, v. 169, p. 753–759, 2012
- [144] Motta, A. C. V.; Monte Serra, B.; Reissman, C. B.; Dionísio, J. A. Micronutrientes na rocha, no solo e na planta. *Synergismus scyentifica*, v. 04. 2007
- [145] Ravet, K.; Reyt, G.; Arnaud, N.; Krouk, G.; Djouani, E.; Boucherez, J.; Briat, J.; Gaymard, F. Iron and ROS control of the DownStream mRNA decay pathway is essential for plant fitness. *The EMBO Journal*, v. 3, p. 175–186, 2012.
- [146] Ravet, K.; Touraine, B.; Boucherez, J.; Briat, J. F.; Gaymard, F.; Cellier, F. Ferritins control interaction between iron homeostasis and oxidative stress in Arabidopsis. *Plant Journal*, v. 57, p. 400–412, 2009.
- [147] Takahashi M.; Nakanishi, H.; Kawasaki. S.; Nishizawa, N.K.; Mori, S Enhanced tolerance of rice to low iron availability in alkaline soils using barley nicotianamine aminotransferase genes. *Nature Biotechnoly*, v. 19, p. 466–469, 2001
- [148] Ross, C. W. *Plant Physiology Laboratory Manual*. Belmont, CA, USA: Wadsworth Publishing Company, 1974
- [149] Schmittgen TD, Livak KJ: Analyzing real-time PCR data by the comparative Ct method. *Nat Protoc*, 3:1101-1108, 2008

- [150] Ricachenevsky, F.K., Sperotto, R.A., Menguer, P.K. et al. zinc-induced facilitator-like family in plants: lineage-specific expansion in monocotyledons and conserved genomic and expression features among rice (*Oryza sativa*) paralogs. *BMC Plant Biol* 11, 20, 2011
- [151] Jain M, Nijhawan A, Tyagi AK, Khurana JP: Validation of housekeeping genes as internal control for studying gene expression in rice by quantitative real-time PCR. *Biochem Biophys Res Commun* 2006, 345:646-651.
- [152] Li, J.L. et al. Natural variation underlines alteration in Nramp aluminium transporter (NRAT1) expression and function that play role in rice aluminum tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 111, 6503-6508 (2014)
- [153] Famoso, A. N.; Clark, R. T.; Shaff, J. E.; Craft, E.; Mccouch, S. R.; Kochian, L. V. Development of a Novel Aluminum Tolerance Phenotyping Platform Used for Comparisons of Cereal Aluminum Tolerance and Investigations into Rice Aluminum Tolerance Mechanisms. *Plant Physiology*, v. 154, p. 1678–1691, 2010.
- [154] Panda, S. K., Baluska, F. & Masumoto, H. Aluminium stress signalling in plants. *Plant Signal. Behav.* 4, 592–597, 2009.
- [155] Abate, E. Hussien, S., Laing, M. and Mengistu, F. Aluminium toxicity tolerance in cereals: mechanisms, genetic control and breeding methods. *F. Afr. J. Agric. Res.* 8, 711-722, 2013
- [156] Sivaguru, M. and Horst, W.J. The distal part of the transition zone is the most aluminum-sensitive apical root zone of maize. *Plant Physiol.* 116: 155-163, 1998
- [157] Ryan, P.R., DiTomaso, J.M. and Kochian, L.V Aluminium toxicity in roots: an investigation of spatial sensitivity and the role of the root cap. *J. Exp. Bot.* 44: 437-446, 1993
- [158] Kochian, L.V., Pineros, M.A. and Hoekenga, O.A. The physiology, genetics and molecular biology of plant aluminum resistance and toxicity. *Plant Soil* 274, 175-195, 2005
- [159] Yokosho, K., Yamaji, N., Fuji-Kashino, M., Ma, J.F. Functional analysis of a MATE gene *OsFRDL2* revealed its involvement in Al-induced secretion of citrate, but lower contribution to Al tolerance in rice, *Plant and Cell Physiology*, Volume 57, Issue 5, 976-985 (2016)

- [160] Yokosho, K., Yamaji, N., Ueno, D., Mitani, N. and Ma, J.F (2009) OsFRDL1 is a citrate transporter required for efficient translocation of iron in rice. *Plant Physiol* 149, 297-305.
- [161] Yokosho, K., Yamaji, N. and Ma, J.F. (2011) Na Al-inducible MATE gene is involved in external detoxification of Al in rice. *Plant J.* 69:1061-1069
- [162] 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
- [163] Inoue, H., Higuchi, K., Takahashi, M., Nakanishi, H., Mori, S. and Nishizawa, N.K. Three rice nicotianamine synthase genes, OsNAS1, OsNAS2 and OsNAS3 are expressed in cells involved in long distance transport of iron and differentially regulated by iron. *Plant* 1, 36:366-381, 2003
- [164] Higuchi, K., Watanabe, S., Takahashi, M., Kawasaki, S., Nakanishi, H., Nishizawa, N.K. and Mori, S. Nicotianamine synthase gene expression differs in barley and rice under Fe deficient conditions. *Plant* 1, 25:159-167, 2001
- [165] Famoso, A.N., Zhao, K., Clark, R.T., Tung, C.W., Wright, M.H., et al. Genetic Architecture of Aluminum Tolerance in Rice (*Oryza sativa*) Determined through Genome-Wide Association Analysis and QTL Mapping. *PLOS Genetics* 7(8), 2011
- [166] Ma, J.F., Chen, Z.C., Shen, R.F. Molecular mechanisms of Al tolerance in gramineous plants. *Plant and Soil*, v.381, p.1-12, 2014
- [167] Yamaji, N., Huang, C.F., Nagao, S., Yano, M., Sato, Y., Nagamura, Y., Ma, J.F. A zinc finger transcription factor ART1 regulates multiple genes implicated in aluminum tolerance in rice. *The plant cell*, v.21, p. 3339-3349, 2009
- [168] Ma, J.F., Chen, Z.F. and Shen, R.F. Molecular mechanisms of Al tolerance in gramineous plants. *Plant Soil* 381:1-12, 2014
- [169] Xia, J., Yamaji, N., Kasai, T. and Ma, J.F. Plasma membrane-localized transporter for aluminum in rice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107:18381-18385, 2010
- [170] Wu, K., Xiao, S., Chen, Q., Wang, Q., Zhang, Y., Li, K., Chen, L. Changes in the activity and transcription of antioxidant enzymes in response to Al stress in black soybeans. *Plant Molecular Biology Reporter*, v.31, p.141-150, 2012

- [171] Kochian, L., Pineros, M.A., Hoekenga, O.A. The physiology, genetics and molecular biology of plant aluminum resistance and toxicity. *Plant and Soil*, v.274, p. 175-195, 2005
- [172] Yi, Y. Ph. D. thesis (Dartmouth College, Hanover, NH, 1995)
- [173] Inanov, R., Brumbarova, T., Bauer, P. Fitting into the harsh reality: regulation of iron-deficiency responses in dicotyledonous plants. *Molecular Plant*, v.5, p.27-42, 2012
- [174] Jin, C.W., Liu, Y., Mao, Q.Q., Wang, Q., Du, S.T. Mild Fe-deficiency improves biomass production and quality of hydroponic-cultivated spinach plants (*Spinacia oleracea* L.). *Food Chemistry*, v. 138, p. 2188-2194, 2013
- [175] Jin, C.W, Du, S.T., Chen, W.W., Li, G.X., Zhang, Y.S., Zheng, S.J. Elevated carbon dioxide improves plant iron nutrition through enhancing the iron-deficiency-induced responses under iron limited conditions in tomato. *Plant Physiology*, V.150, p.272-280, 2009
- [176] Giehl, R.F., Lima, J.E., Wrenn, N.V. Localized iron supply triggers lateral root elongation in *Arabidopsis* by altering the AUX1 mediated auxin distribution. *Plant Cell*, v.24, p.33-49, 2012
- [177] Sivaguru, M., Fujiwara, T., Samaj, J., Baluska, F., Yang, Z., Osawa, H., Maeda, T., Mori, T., Volkmann, D., Matsumoto, H. Aluminum induced 1 \rightarrow 3- β -D-glucan inhibits cell-to-cell trafficking of molecules through plasmodesmata. A new mechanism of aluminum toxicity in plants. *Plant Biology*, v.124, p.991-1006, 2000
- [178] Büyükkeskin, T., Akinci, Ş., Eroğlu, A.E. The effects of humic acid on root development and nutrient uptake of *vicia faba* L. (Broad Bean) seedlings grown under aluminum toxicity. *Soil Science and Plant Analysis*, v.46, p.277-292, 2015
- [179] Chen Y.T., Wang, Y., Yeh, K.C. Role of root exudates in metal acquisition and tolerance. *Current Opinion in Plant Biology*, v.39, p.66-72 (2017)
- [180] Msilini, N., Essemine, J., Zaghdoudi, M., Harnois, J., Lachaâl, M., Ouerghi, Z., Carpentier, R. How does iron deficiency disrupt the electron flow in photosystem I of lettuce leaves ? *Journal of Plant Physiology*, v.170, p.1400-1406 (2013)
- [181] Vigani, G., Briat, J.F. Impairment of respiratory chain under nutrient deficiency in plants: Does it play a role in the regulation of iron and sulfur responsive genes? *Frontiers in Plant Science*, v.6 (2016)

[182] Liu, J., Magalhaes, J.V., Shaff, J., Kochian, L.V. Aluminum-activated citrate and malate transporters from the MATE and ALMT families function independently to confer *Arabidopsis* aluminum tolerance. *The Plant Journal*, v.57, p.389-399 (2010)

[183] Nhan, P.P., Hai, N.T. Amelioration of aluminum toxicity on OM4900 rice seedlings by sodium silicate. *African Journal of Plant Science*, v.7, p. 208-212 (2013)