

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

Bianca Knebel Del Frari

**PAPEL DO TRANSPORTADOR OsHMA5 NAS RESPOSTAS DE
PLANTAS DE ARROZ (*Oryza sativa* L.) À DEFICIÊNCIA E EXCESSO
DE COBRE**

Santa Maria, RS
2018

Bianca Knebel Del Frari

**PAPEL DO TRANSPORTADOR OsHMA5 NAS RESPOSTAS DE PLANTAS DE
ARROZ (*Oryza sativa* L.) À DEFICIÊNCIA E EXCESSO DE COBRE**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Agronomia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Agronomia**.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Teixeira Nicoloso

Santa Maria, RS
2018

Del Frari, Bianca Knebel

Papel do transportador OsHMA5 nas respostas de plantas de arroz (*Oryza sativa* L.) à deficiência e excesso de cobre / Bianca Knebel Del Frari.- 2018.
85 p.; 30 cm

Orientador: Fernando Teixeira Nicoloso
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós Graduação em Agronomia, RS, 2018

1. Fotoquímica 2. Metais pesados 3. MicroRNAs 4.
Mutante I. Nicoloso, Fernando Teixeira II. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

©2018

Todos os direitos autorais reservados a Bianca Knebel Del Frari. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

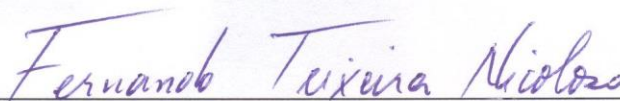
E-mail: biancakdfri@gmail.com

Bianca Knebel Del Frari

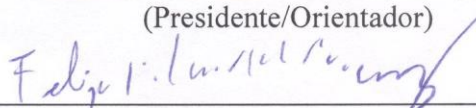
**PAPEL DO TRANSPORTADOR OsHMA5 NAS RESPOSTAS DE PLANTAS DE
ARROZ (*Oryza sativa* L.) À DEFICIÊNCIA E EXCESSO DE COBRE**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Agronomia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Agronomia**.

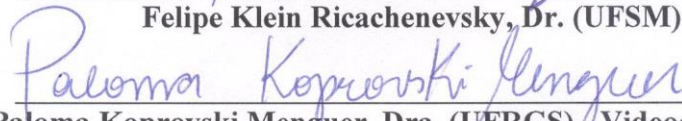
Aprovado em 16 de janeiro de 2018:



Fernando Teixeira Nicoloso, Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientador)



Felipe Klein Ricachenevsky, Dr. (UFSM)



Paloma Koprovski Menguer, Dra. (UFRGS) - Videoconferência

Santa Maria, RS
2018

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer à minha família por sempre me apoiar e incentivar para alcançar meus objetivos. Muito obrigada por todo amor e compreensão.

Ao Professor Fernando Teixeira Nicoloso pela orientação, pelos conhecimentos compartilhados, confiança em meu trabalho, compreensão e apoio.

Ao Professor Felipe Ricachenevsky pela contribuição para a realização deste trabalho, pelo exemplo, compreensão e aprendizado recebido.

Ao meu porto seguro, meu marido Rafael. Muito obrigada pelo apoio, carinho, amor, paciência e por estar ao meu lado em todos os momentos. Te amo!

Aos amigos e colegas de laboratório Anderson, Camila C., Camila T., Henrique, Hilda, Marília, Melissa, Milena, Mirian, Júlia, Liliani, Lucas, Luis Henrique, Pedro e em especial a minha amiga Raíssa, agradeço a todos pela parceria e pelo auxílio na execução dos experimentos e análises.

Às minhas amigas pelo apoio, especialmente Cá, Manu e Tami.

À Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia pela oportunidade de realização do curso de mestrado, pela infraestrutura e recursos para condução deste trabalho.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos para realizar esta pesquisa.

Por fim, o meu sincero muito obrigada a todos que contribuíram para realização deste trabalho.

RESUMO

PAPEL DO TRANSPORTADOR OsHMA5 NAS RESPOSTAS DE PLANTAS DE ARROZ (*Oryza sativa* L.) À DEFICIÊNCIA E EXCESSO DE COBRE

AUTORA: Bianca Knebel Del Frari
ORIENTADOR: Fernando Teixeira Nicoloso

O cobre (Cu) é um elemento mineral essencial em função de ser cofator de muitas proteínas que participam em processos fisiológicos importantes, como a plastocianina na cadeia de transporte de elétrons na fotoquímica. Entretanto, seu excesso ou deficiência pode implicar em efeitos negativos a vários componentes celulares. Assim, através de diferentes mecanismos as plantas precisam manter a homeostase de Cu nas células. Dentre esses mecanismos, em *Arabidopsis thaliana* já foi caracterizado um mecanismo em resposta à deficiência de Cu, conhecido como economia de Cu. Apesar do crescente avanço na caracterização de proteínas envolvidas na homeostase de Cu, ainda é necessário entender suas relações com processos fisiológicos importantes, como a fotossíntese, e os mecanismos relacionados a tolerância e a deficiência de Cu em diferentes espécies vegetais. Nesse contexto, o objetivo do presente trabalho foi caracterizar aspectos relacionados à homeostase de Cu em *Oryza sativa* através do papel do transportador OsHMA5, bem como de parâmetros fisiológicos, morfológicos e moleculares do tipo selvagem (cv. Nipponbare) e do mutante *oshma5*. O trabalho foi conduzido em sala de crescimento controlada, no qual plantas do tipo selvagem (cv. Nipponbare) e do mutante *oshma5* foram submetidas a três concentrações de Cu (sem adição de Cu “0”; 0,2 e 20 μM) em solução nutritiva durante 13 dias. Em resposta a deficiência de Cu, plantas do tipo selvagem apresentaram maior expressão do transportador de Cu *OsCOPT1* e diminuição dos parâmetros fotossintéticos ETR e Y(II), antes de demonstrarem redução em parâmetros de crescimento. Além disso, o tipo selvagem na condição de deficiência de Cu apresentou o mesmo comportamento do mutante *oshma5* nos parâmetros ETR e Y(II). Houve menor concentração de elementos minerais (Cu, Fe, Mg e Zn) nos tecidos de parte aérea do mutante *oshma5* em 20 μM de Cu em relação ao tipo selvagem. No entanto, o tipo selvagem apresentou maior concentração desses elementos na parte aérea de plantas submetidas a 20 μM de Cu em relação às demais concentrações de Cu. Porém, ambos apresentaram menor concentração de Mn nos tecidos de raízes com o aumento da concentração de Cu na solução nutritiva. Ainda, a maior concentração de Cu na solução nutritiva ocasionou efeitos negativos em parâmetros de crescimento (matéria seca de raízes e de parte aérea, área foliar, comprimento e área de superfície de raízes) no tipo selvagem e no mutante *oshma5*, evidenciando que o transportador OsHMA5 não contribui de modo significativo à tolerância ao excesso de Cu. No tipo selvagem, os miRNAs analisados (*miRNA397ab*, *miRNA398b* e *miRNA408*) são induzidos em deficiência de Cu, sendo assim parece que o mecanismo de economia de Cu é conservado em *Oryza sativa*.

Palavras-chave: Fotoquímica. Metais pesados. MicroRNAs. Mutante.

ABSTRACT

ROLE OF OsHMA5 TRANSPORTER IN THE RESPONSES OF RICE PLANTS (*Oryza sativa* L.) TO THE COPPER DEFICIENCY AND EXCESS

AUTHOR: Bianca Knebel Del Frari
ADVISOR: Fernando Teixeira Nicoloso

Copper (Cu) is an essential mineral element as a cofactor of many proteins that participate in important physiological processes, such as plastocyanin that acts in the electron transport chain in photochemistry. However, its excess or deficiency may imply several negative effects on cells components. Therefore, the plants need to maintain Cu homeostasis on the cells through different mechanisms. Among them, a mechanism in response to Cu deficiency, known as Cu economy, has already been characterized in *Arabidopsis thaliana*. Despite of the growing advance in characterization of proteins involved in Cu homeostasis, it is still necessary to understand its relations with important physiological processes, such as photosynthesis, and mechanisms related to Cu tolerance and deficiency in different plant species. In this context, the objective of the present work was to characterize aspects related to Cu homeostasis in *Oryza sativa* through the role of the OsHMA5 transporter, as well as physiological, morphological and molecular parameters of both wild type (cv. Nipponbare) and *oshma5* mutant. The experiment was carried out in a controlled growth room in which wild type (cv. Nipponbare) and *oshma5* mutant plants were submitted to three concentrations of Cu (without addition of Cu "0"; 0.2 and 20 μ M) in nutrient solution for 13 days. In response to Cu deficiency, wild type plants showed higher expression of the *OsCOPT1* Cu transporter and lower photosynthetic parameters of ETR and Y(II), before demonstrating reduction in growth parameters. In addition, the wild type in the Cu deficiency condition showed the same behavior of the *oshma5* mutant in the ETR and Y(II) parameters. There was lower concentration of mineral elements (Cu, Fe, Mg and Zn) in the shoot of the *oshma5* mutant in 20 μ M of Cu compared to the wild type. However, the wild type presented higher concentration of these elements in the shoot of plants submitted to 20 μ M of Cu in relation to the other concentrations of Cu. However, both presented lower Mn concentration on root tissues with the Cu increases in the nutrient solution. In addition, the higher concentration of Cu in the nutrient solution caused negative effects on growth parameters (dry matter of roots and shoot, leaf area, length and root surface area) in wild type and *oshma5* mutant, evidencing that the transporter OsHMA5 does not contribute significantly to tolerance of Cu excess. In the wild type, the miRNAs analyzed (*miRNA397ab*, *miRNA398b* and *miRNA408*) are induced in Cu deficiency, so it seems that the Cu economy mechanism is conserved in *Oryza sativa*.

Keywords: Photochemistry. Heavy metals. MicroRNAs. Mutant.

LISTA DE FIGURAS

REFERENCIAL TEÓRICO

Figura 1 – Modelo de absorção de Cu através da membrana plasmática em *Arabidopsis thaliana*.
.....41

ARTIGO

Figura 1 – Matéria seca de parte aérea (a), comprimento de colmo (b), área foliar (c) e comparação de plantas do tipo selvagem (cv. Nipponbare) e do mutante *oshma5* nas diferentes concentrações de Cu na solução nutritiva aos 13 dias de tratamento.52

Figura 2 – Matéria seca de raízes (a), comprimento de raízes (b), diâmetro médio de raízes (c), área de superfície de raízes (d) e volume de raízes (e) de plantas do tipo selvagem (cv. Nipponbare) e do mutante *oshma5* nas diferentes concentrações de Cu na solução nutritiva aos 13 dias de tratamento.53

Figura 3 – Concentração de Cu (a), Mg (c), Fe (d), K (g) e Zn (i) na última folha completamente expandida e de Cu (b), Fe (e), Mn (f) e K (h) em tecidos de raízes no tipo selvagem (cv. Nipponbare) e no mutante *oshma5* aos 13 dias de tratamento.55

Figura 4 – Concentração de clorofila *a* (a), clorofila *b* (b), clorofila total (c) e carotenoides (d) em folhas de plantas do tipo selvagem (cv. Nipponbare) e do mutante *oshma5* aos 13 dias de tratamento. Diferença visual de coloração entre plantas do tipo selvagem (à esquerda) e mutante *oshma5* (à direita) em solução controle (0,2 µM de Cu) (e).56

Figura 5 – Taxa de transporte de elétrons (ETR) relativa a radiação fotossinteticamente ativa (PAR) em folhas do tipo selvagem (cv. Nipponbare) e do mutante *oshma5* aos 7 (a) e 13 (b) dias de tratamento.57

Figura 6 – Rendimento quântico efetivo do fotossistema II (Y(II)) em folhas do tipo selvagem (cv. Nipponbare) e mutante *oshma5* aos 7(a;b) e 13(c;d) dias de tratamento (7 dias, n=4; 13 dias, n=5).58

Figura 7 – Concentração de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em raízes (a) e em folhas (b) no tipo selvagem (cv. Nipponbare) e no mutante *oshma5* aos 13 dias de tratamento.59

Figura 8 – Atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) em raízes (a) e em folhas (b) no tipo selvagem (cv. Nipponbare) e no mutante *oshma5* aos 13 dias de tratamento de Cu.60

Figura 9 – Expressão de *miRNA397ab* (a), *miRNA398b* (b), *miRNA408* (c), *OsCOPT1* (d) e *OsCSD2* (e) no tipo selvagem (cv. Nipponbare) aos 13 dias de tratamento.61

Figura 10 – Plantas no momento da transferência às unidades experimentais, tipo selvagem (à esquerda) e mutante *oshma5* (à direita).78

Figura 11 – Fluorescência inicial (F_o) no tipo selvagem (cv. Nipponbare) e mutante *oshma5* aos 7 dias (a) e 13 dias (c) de tratamento. Fluorescência máxima (F_m) no tipo selvagem (cv. Nipponbare) e mutante *oshma5* aos 7 dias (b) e 13 dias (d) de tratamento. Rendimento quântico máximo do PSII (F_v/F_m) no tipo selvagem (cv. Nipponbare) e mutante *oshma5* aos 13 dias de tratamento (e).78

LISTA DE QUADROS

REFERENCIAL TEÓRICO

Quadro 1 – Transportadores de Cu já caracterizados em *Oryza sativa*. Sendo, indução da expressão (↑exp.), redução da expressão (↓exp.), supressão da expressão (↓↓exp.) e desconhecido (?). 33

ARTIGO

Quadro 1 – Primers utilizados neste trabalho. 76

LISTA DE TABELAS

ARTIGO

Tabela 1 – Concentração de Zn, Mn, Mg, Ca e P nos tecidos de raízes e da última folha completamente expandida no tipo selvagem (cv. Nipponbare) e mutante <i>oshma5</i> cultivados em solução nutritiva aos 13 dias de tratamento.....	77
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

At	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ATP	Adenosina trifosfato
cDNA	DNA complementar
COPT/CTR	Proteínas transportadoras de Cu (<i>COPper Transporter protein</i>)
Cu	Cobre
CuRE	Elementos de resposta ao Cu
CuZnSOD	Cobre-zinco superóxido dismutase
cv.	Cultivar
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ETR	Taxa de transporte de elétrons
FeSOD	Ferro superóxido dismutase
Fm	Fluorescência máxima
Fo	Fluorescência mínima
FRO	Oxidase-redutase férrica
Fv/Fm	Rendimento quântico máximo do PSII
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
HMA	Domínio associado a metal pesado (<i>Heavy Metal Associated domain</i>)
MF	Matéria fresca
miRNA	MicroRNA
MnSOD	Manganês superóxido dismutase
MS	Matéria seca
NA	Nicotianamina
Os	<i>Oryza sativa</i>
PAR	Radiação fotossinteticamente ativa
PCR	Reação em cadeia da polimerase (<i>Polymerase chain reaction</i>)
PGK	3-fosfoglicerato quinase
PPO	Polifenol oxidase
PSI	Fotossistema I
PSII	Fotossistema II
RNA	Ácido ribonucleico
RT-qPCR	PCR em tempo real quantitativo com transcrição reversa (<i>Real Time Quantitative Reverse Transcription PCR</i>)
RUBISCO	Ribulose-1,5-bifosfato carboxilase oxidase
<i>Tos17</i>	Transposon de <i>Oryza sativa</i> 17
SBP	Promotor Squamosa ligante a proteínas (<i>Squamosa promoter binding proteins</i>)
SOD	Superóxido dismutase
SPL	Promotor semelhante à Squamosa ligante a proteínas (<i>Squamosa promoter binding like protein</i>)
Y(II)	Rendimento quântico fotoquímico efetivo do PSII
YSL	Proteína semelhante à yellow stripe (<i>yellow stripe-like protein</i>)
ZIP	Proteína ZRT-IRT (<i>zinc-regulated transporters- iron-regulated transporter</i>)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
1.1 OBJETIVOS	13
1.1.1 Objetivo geral.....	13
1.1.2 Objetivos específicos.....	13
2 REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1 IMPORTÂNCIA DO COBRE ÀS PLANTAS	14
2.1.1 Proteínas cúpricas	14
2.2 DEFICIÊNCIA DE COBRE EM PLANTAS	17
2.3 TOXIDEZ DE COBRE EM PLANTAS	21
2.4 TRANSPORTE DE COBRE.....	26
2.4.1 Famílias de transportadores de cobre	26
2.4.1.1 Família CTR/COPT.....	27
2.4.1.2 Família P _{1B} -ATPases/ HMA	27
2.4.1.3 Família ZIP	28
2.4.1.4 Família YSL	29
2.4.2 Transportadores de cobre em arroz	29
2.4.3 Chaperonas envolvidas no transporte de Cu	39
2.4.4 Absorção de cobre	39
3 ARTIGO – ASPECTOS FISIOLÓGICOS, MORFOLÓGICOS E MOLECULARES DA HOMEOSTASE DE COBRE EM ARROZ (<i>Oryza sativa</i> L.) E A CONTRIBUIÇÃO DO TRANSPORTADOR OsHMA5	42
RESUMO	42
ABSTRACT	42
INTRODUÇÃO.....	43
MATERIAL E MÉTODOS.....	45
RESULTADOS	50
DISCUSSÃO	61
CONCLUSÕES	70
REFERÊNCIAS	70
MATERIAL SUPLEMENTAR	76
REFERÊNCIAS	79

1 INTRODUÇÃO

O cobre (Cu) está envolvido em muitos processos fisiológicos importantes nos vegetais em função de ser cofator de proteínas como as cobre-zinco superóxido dismutase (CuZnSODs), citocromo *c* oxidase, plastocianina, polifenol oxidase, proteínas da via de secreção, como as lacases e plantacianinas, e ainda, do receptor de etileno (ETR1) (BURKHEAD et al., 2009; RODRÍGUEZ et al., 1999; YRUELA, 2009). Assim, o Cu é um micronutriente e sua essencialidade está muito relacionada com sua propriedade redox, a qual permite sua participação em reações de transferência de elétrons (YRUELA, 2005). Porém, a mesma propriedade também pode contribuir para sua toxidez aos organismos vivos (BERNAL et al., 2012; BURKHEAD et al., 2009; YRUELA, 2005).

O excesso de metais pesados nas células pode aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), como o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), oxigênio singlete (1O_2) e radical hidroxil (OH^{\cdot}) (GILL; TUTEJA, 2010; RAVET; PILON, 2013; SHARMA et al., 2012). Por consequência, em condições de excesso de Cu pode ocorrer um desbalanço entre a concentração de EROs e o sistema antioxidante vegetal, resultando no estresse oxidativo nas células (GILL; TUTEJA, 2010; SHARMA et al., 2012; SHINAKAI et al., 2003). O sistema de defesa vegetal possui antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos (SHARMA et al., 2012). Dentre esses, as enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), incluindo as CuZnSOD, são consideradas a primeira linha de defesa de plantas contra espécies reativas de oxigênio (EROs) (GILL et al., 2015; GILL; TUTEJA, 2010). Essas metaloenzimas são responsáveis pela conversão do $O_2^{\cdot-}$ em H_2O_2 e O_2 , reduzindo assim a possibilidade da reação de Haber-Weiss, pois $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 são substratos para essa reação (GILL et al., 2015; GILL; TUTEJA, 2010).

Com intuito de evitar possíveis danos em componentes celulares e ao metabolismo vegetal, as plantas precisam regular a concentração de Cu nas células (YRUELA, 2009). Assim, para manter a homeostase de Cu são necessários diferentes transportadores de membrana que controlam a concentração e distribuição adequada de Cu nos tecidos e células, além de proteínas reguladoras, como os fatores de transcrição, e quelantes, como as metalotioneínas (CLEMENS, 2001; PEÑARRUBIA et al., 2015; YRUELA, 2005; YRUELA, 2009).

Ainda, como o Cu é um elemento mineral essencial, sua deficiência também é prejudicial às plantas (YRUELA, 2009). Em resposta à deficiência de Cu, em geral, as plantas podem apresentar estratégias como aumentar a expressão de transportadores relacionados a absorção desse metal e/ou adaptar seu metabolismo para otimizar o uso do Cu (BERNAL et al.,

2012; YAMASAKI et al., 2009). Nesse sentido, sabe-se que plantas de *Arabidopsis thaliana* apresentam um mecanismo conhecido como economia de Cu, no qual o Cu é direcionado com prioridade a proteínas que participam de processos fundamentais no metabolismo vegetal, como a plastocianina e reduz o uso de Cu por proteínas que podem ser substituídas, como as CuZnSODs pelas FeSODs, bem como por proteínas consideradas menos essenciais ao metabolismo vegetal (ABDEL-GHANY; PILON, 2008; BURKHEAD et al., 2009). O regulador desse mecanismo em *Arabidopsis thaliana* é o fator de transcrição SPL7, o qual pode regular indiretamente proteínas cúpricas a partir de microRNAs específicos ou diretamente proteínas envolvidas na homeostase de Cu via ligação em sequências específicas no promotor dos genes alvos (YAMASAKI et al., 2009). Parece que esse mecanismo de adaptação à deficiência de Cu pode ser conservado em arroz (*Oryza sativa* L.), devido seu genoma codificar microRNAs homólogos aos que participam desse mecanismo em *A. thaliana* (YAMASAKI; PILON; SHIKANAI, 2008).

O arroz além de ser uma importante cultura agrícola no mundo, apresenta uma base de dados moleculares bem estabelecida, assim é uma planta modelo para estudos em monocotiledôneas (SONG et al., 2013). Até o momento, já foram descritos transportadores de Cu em arroz membros das famílias COPT (YUAN et al., 2010; YUAN et al., 2011), YSL (ZHENG et al., 2012) e HMA (DENG et al., 2013; HUANG et al., 2016; LEE et al., 2007).

O conhecimento do transporte de metais nos vegetais pode contribuir para ser utilizado na engenharia genética com intuito de obter plantas com tolerância e acúmulo alteradas para determinado metal, como o Cu (PILON-SMITS; PILON, 2002; YRUELA, 2005). Desse modo, pode-se desenvolver plantas para o uso na fitorremediação, para aumentar a produtividade de diferentes culturas em solos com excesso ou deficiência de Cu, e ainda, para aumentar ou reduzir a entrada de Cu na cadeia alimentar (HUANG et al., 2016; PILON-SMITS; PILON, 2002; YRUELA, 2005).

Apesar de um crescente interesse nos últimos anos sobre a homeostase de Cu em plantas, muitos transportadores de Cu precisam ser identificados e caracterizados. Ainda, é necessário entender como influenciam em processos fisiológicos importantes, como a fotossíntese, e os mecanismos relacionados a tolerância e a deficiência de Cu em diferentes espécies vegetais. Desse modo, este trabalho objetiva compreender melhor aspectos relacionados com a homeostase de Cu, bem como sobre o papel do transportador OsHMA5 em *Oryza sativa*, através de parâmetros fisiológicos, morfológicos e moleculares com o uso do tipo selvagem (cv. Nipponbare) e do mutante *oshma5*.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Este trabalho teve como objetivo geral estudar a homeostase de Cu em *Oryza sativa* através de um mutante com perda de função no gene *OsHMA5* (*Heavy Metal Associated 5*).

1.1.2 Objetivos específicos

Caracterizar a expressão de genes relacionados à homeostase de Cu em plantas do tipo selvagem (cv. Nipponbare).

Analisar alterações em parâmetros fotossintéticos em folhas de plantas do mutante *oshma5* e do tipo selvagem sob diferentes concentrações de Cu.

Avaliar aspectos bioquímicos e morfológicos em plantas do mutante *oshma5* e do tipo selvagem sob diferentes concentrações de Cu.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 IMPORTÂNCIA DO COBRE ÀS PLANTAS

O Cu é um micronutriente e sua essencialidade está relacionada, principalmente, com sua habilidade de variar entre sua forma oxidada (Cu^{2+}) e reduzida (Cu^+), a qual permite sua participação em reações de transferência de elétrons (YRUELA, 2009; YRUELA, 2013). A forma Cu^{2+} tem maior facilidade de se ligar ao nitrogênio no resíduo de histidina, já a forma que é mais instável, Cu^+ , possui afinidade com o enxofre nos resíduos de cisteína e metionina (YRUELA, 2013). Por essa facilidade de interagir com esses elementos mais de 98% do Cu no tecido vegetal se encontra na forma complexada (MARSCHNER, 2012).

Existem muitas proteínas dependentes de Cu, entre essas estão as cobre-zinco superóxido dismutase (CuZnSODs), citocromo *c* oxidase, plastocianina, polifenol oxidase, proteínas da via de secreção, como as lacases e plantacianinas, e ainda, o receptor de etileno (ETR1) (BURKHEAD et al., 2009; SHIKANAI et al., 2003; RODRÍGUEZ et al., 1999; YRUELA, 2009). Por consequência, é um elemento que participa em processos fundamentais no metabolismo vegetal como a fotossíntese, respiração, metabolismo da parede celular, percepção hormonal e na proteção contra o estresse oxidativo (BURKHEAD et al., 2009; MARSCHNER, 2012; YRUELA, 2005; YRUELA, 2009).

2.1.1 Proteínas cúpricas

A plastocianina possui um átomo de Cu em sua estrutura e é a proteína cúprica em maior concentração nos cloroplastos (MARSCHNER, 2012; YRUELA, 2013). É uma proteína solúvel e possui uma massa molecular de aproximadamente 10,5 kDa (YRUELA, 2013). Localiza-se, mais especificamente, no lúmen dos tilacoides e é responsável pelo transporte de elétrons entre o citocromo *b₆f* e o fotossistema I (PSI) na fase fotoquímica (SHIKANAI et al., 2003; YRUELA, 2013). Pode ser encontrada nos cloroplastos na forma holoplastocianina (contém Cu) e na forma instável apoplastocianina (sem Cu), sendo a última predominante quando há deficiência de Cu nos cloroplastos (ABDEL-GHANY et al., 2005; LI et al., 1990; SHIKANAI et al., 2003).

Em *Arabidopsis* há dois genes nucleares que codificam para plastocianina (*PETE1* e *PETE2*), os quais se diferenciam quanto à regulação em relação ao Cu e não há uma

compensação entre eles (ABDEL-GHANY, 2009). O acúmulo de PETE1 é independente da concentração de Cu e é uma proteína fundamental para o transporte de elétrons em condições de deficiência de Cu, já que o mutante *pete2* apresentou uma taxa de transporte de elétrons similar ao tipo selvagem nessas condições (ABDEL-GHANY, 2009). O mesmo autor verificou que a PETE2 é a isoforma predominante e há um acúmulo dessa proteína conforme o incremento gradual nas concentrações de Cu, atingindo seu pico máximo em 8 μM de Cu, porém em uma concentração de Cu considerada tóxica aos vegetais (50 μM) há uma redução na quantidade de PETE2. Pela PETE2 ter sua regulação dependente da concentração de Cu, sugere-se que essa exerça um papel também como tampão de Cu em maiores concentrações desse elemento, reduzindo a quantidade de Cu livre no citoplasma (ABDEL-GHANY, 2009). Parece que a regulação de PETE2 ocorre pós-transcricionalmente, o que significa que possivelmente essa regulação pode ocorrer durante a tradução, no transporte ao lúmen dos tilacoides, no processamento ou na estabilidade da proteína (ABDEL-GHANY, 2009).

As enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) são consideradas a primeira linha de defesa de plantas contra espécies reativas de oxigênio (EROs) (GILL et al., 2015; GILL; TUTEJA, 2010). As SODs são responsáveis pela conversão de $\text{O}_2^{\cdot-}$ (ânion superóxido) em H_2O_2 e O_2 , reduzindo assim a possibilidade da reação de Haber-Weiss, pois $\text{O}_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 são substratos para essa reação (GILL et al., 2015; GILL; TUTEJA, 2010). As isoformas da enzima SOD estão presentes em diferentes organelas celulares e requerem pelo menos um metal como cofator enzimático, como o Cu e Zn (CuZnSODs), o Fe (FeSODs) e Mn (MnSODs) (GILL et al., 2015). Porém, as CuZnSODs são predominantes em condições adequadas de Cu durante o crescimento vegetal (RAVET; PILON, 2013).

As CuZnSODs possuem massa molecular de 32,5 kDa e funcionam como dímeros, em cada subunidade há um átomo de Cu e outro de zinco (Zn), os quais estão ligados por uma histidina (MARSCHNER, 2012; RAVET; PILON, 2013). Em *Arabidopsis*, existem três isoformas para essa proteína, sugere-se que se localizam no citosol (CSD1), no estroma dos cloroplastos (CSD2) e nos peroxissomos (CSD3) (ABDEL-GHANY; PILON, 2008; BURKHEAD et al., 2009; GILL et al., 2015). Já no genoma de *Oryza sativa* há quatro genes codificantes para CuZnSOD e de acordo com Gill et al. (2015) suas possíveis localizações subcelulares são: OsCSD1 (citosol/peroxissomo), OsCSD2 (citosol), OsCSD3(citosol) e OsCSD4 (cloroplastos).

As CuZnSODs são reguladas em resposta ao Cu, visto que na deficiência de Cu há um menor acúmulo dessas proteínas (ABDEL-GHANY; PILON, 2008; YAMASAKI et al., 2007; YAMASAKI et al., 2009). A regulação ocorre em nível pós-transcricional e não envolve os

promotores dos genes, e sim é mediada via o *miRNA398* (ABDEL-GHANY; PILON, 2008; SUNKAR; KAPOOR; ZHU, 2006; YAMASAKI et al., 2007). Além disso, transcritos das isoformas CSD1 e CSD2 foram encontrados em diferentes órgãos de *Arabidopsis* como folhas, colmo, raízes e flores quando o Cu está presente em concentração considerada suficiente ao crescimento (ABDEL-GHANY; PILON, 2008).

O Cu^+ também é cofator de muitas enzimas oxidases, visto sua facilidade de se ligar em moléculas como o O_2 (YRUELA, 2009). Entre essas, destaca-se a enzima citocromo *c* oxidase, a qual é uma enzima terminal da cadeia de transporte de elétrons da respiração (CARR; WINGE, 2003). Localiza-se na membrana interna das mitocôndrias e possui capacidade de converter o O_2 em H_2O (CARR; WINGE, 2003; PALUMAA et al., 2004). A citocromo *c* oxidase é composta de diferentes subunidades, sendo algumas codificadas pelo genoma mitocondrial e outras pelo genoma nuclear (CARR; WINGE, 2003).

As lacases são glicoproteínas oxidases, portanto, também utilizam oxigênio para oxidar seus substratos (ZHAO et al., 2013). Na estrutura das lacases há quatro átomos de Cu (TURLAPATI et al., 2011). A maioria dos estudos que abordam a função dessas enzimas mostram que estão relacionadas, principalmente, com resistência a doenças e biossíntese de lignina (LIU et al., 2017). Existem 17 genes no genoma de *Arabidopsis* que codificam para as lacases (TURLAPATI et al., 2011). Muitas dessas (*LAC2*, *LAC4*, *LAC7*, *LAC12*, *LAC13* e *LAC17*) são negativamente reguladas em deficiência de Cu via microRNAs (miRNAs) (ABDEL-GHANY; PILON, 2008). Em *Oryza sativa* há 30 genes codificantes para lacases, essas enzimas se localizam, principalmente, na via de secreção, como parede celular e espaços intercelulares (LIU et al., 2017). A maior expressão de lacases ocorre em raízes durante os estágios vegetativos, onde podem estar envolvidas no alongamento e engrossamento radicular, além disso, algumas podem ser encontradas nas mitocôndrias e cloroplastos (LIU et al., 2017). Em *Oryza sativa*, o gene *OsLAC10* é induzido por diferentes fatores e é muito expresso em raízes (LIU et al., 2017). Ao superexpressar *OsLAC10* em *Arabidopsis*, verificou-se que há um maior acúmulo de lignina em raízes de plantas transgênicas em relação ao tipo selvagem, bem como essas plantas cresceram melhor em meio contendo Cu e absorveram menos esse elemento, o que pode estar relacionado ao aumento da tolerância ao Cu (LIU et al., 2017).

A ascorbato oxidase faz parte das multi-Cu oxidases e é responsável por catalisar a oxidação de ácido ascórbico em monodeidroascorbato (MDHA) no apoplasto, ao mesmo tempo que realiza a redução do O_2 em H_2O (OHKAWA et al., 1989; PIGNOCCHI et al., 2003; YRUELA, 2009). Pignocchi et al. (2003) observaram que a enzima ascorbato oxidase possui efeito no crescimento em plantas de tabaco, visto que o aumento de sua atividade resultou em

maior acúmulo de biomassa de parte aérea e maior alongamento dos entrenós (PIGNOCCHI et al., 2003).

As enzimas PPOs apresentam dois átomos de Cu em sua estrutura e utilizam o O₂ para oxidar polifenóis em quinonas (compostos antimicrobianos), e ainda estão envolvidas na lignificação em defesa a microrganismos (MAYER, 2006; MOHAMMADI; KAZEMI, 2002). Sabe-se que as PPOs estão presentes nos plastídeos de diferentes espécies vegetais (MAYER, 2006). Porém, não foram encontradas atividades dessas enzimas em *Arabidopsis thaliana* (SCHUBERT et al., 2002). Em *Populus trichocarpa*, observou-se que as PPOs localizadas no lúmen dos tilacoides são reguladas negativamente via miRNA1444 em condição limitante de Cu (RAVET et al., 2011).

Dentre as enzimas do grupo das amina oxidases, o Cu faz parte das enzimas denominadas Cu-amina oxidases (Cu-AOs) (MEDDA; PADIGLIA; FLORIS, 1995). Essas enzimas utilizam o O₂ para catalisar a oxidação de aminas, mais especificamente, diaminas e poliaminas nos respectivos aldeídos, formando H₂O₂ e NH₃ (amônia) (MEDDA; PADIGLIA; FLORIS, 1995). O H₂O₂ permite que a Cu-AO esteja envolvida em alguns processos fisiológicos importantes, como induzir defesa a estresses bióticos no apoplasto e contribuir na hipersensibilidade à morte celular (CONA et al., 2006). Cona et al. (2006) também comentam que a Cu-AO pode participar em relações simbióticas nas quais pode mediar a colonização do tecido via alteração da parede celular.

As plantacianinas fazem parte da família de fitocianinas (PRINTZ et al., 2016). Apresentam em sua estrutura quatro aminoácidos (duas histidinas, uma cisteína e uma metionina) que formam o local de ligação com o Cu (PRINTZ et al., 2016). Encontram-se no apoplasto e são codificadas por um único gene em *Arabidopsis* (DONG; KIM; LORD, 2005). Entre as diferentes funções dessas proteínas, Dong, Kim e Lord (2005) sugerem que podem estar envolvidas na reprodução em *Arabidopsis*, atuando mais especificamente no desenvolvimento da antera e na polinização. Em *Oryza sativa*, os membros da família de fitocianinas parecem atuar na defesa contra estresses abióticos como seca, frio e salinidade (MA et al., 2011).

2.2 DEFICIÊNCIA DE COBRE EM PLANTAS

A concentração média de Cu varia de 6 a 80 mg kg⁻¹ em diferentes solos no mundo (BRUNETTO et al., 2016). No entanto, sugere-se que uma concentração de Cu no solo abaixo de 10 mg kg⁻¹ já pode ser considerada deficiência (KABATA-PENDIAS, 2011). Assim, a

deficiência de Cu em plantas pode estar associada a uma menor concentração de Cu no solo e também às propriedades do solo que podem reduzir sua mobilidade e disponibilidade (KABATA-PENDIAS, 2011). Dentre essas propriedades do solo estão um maior conteúdo de argila, maior conteúdo de óxidos de Fe e Mn, bem como de matéria orgânica, menor capacidade de troca de cátions, pH básico, entre outros fatores (KABATA-PENDIAS, 2011; ROONEY; ZHAO; McGRATH, 2006; YRUELA, 2009).

Em geral, considera-se que os sintomas visuais de deficiência iniciam em concentrações de Cu na matéria seca do tecido vegetal inferiores a $5 \mu\text{g g}^{-1}$ (BURKHEAD et al., 2009; MARSCHNER, 1995). Plantas podem responder à deficiência de Cu através da indução na expressão de diversos genes, o que pode resultar em modificações morfológicas e fisiológicas em raízes e folhas (YRUELA, 2009). Os sintomas mais associados a deficiência de Cu são redução da biomassa e de crescimento, clorose em folhas jovens, redução na atividade fotossintética e da fertilidade do pólen, etc. (HUANG et al., 2016; MARSCHNER, 1995; YRUELA, 2013). Abdel-Ghany e Pilon (2008) observaram em plantas de *Arabidopsis thaliana* sob condição de deficiência de Cu que os sintomas de clorose iniciaram na ponta das folhas jovens e posteriormente se estenderam às margens foliares.

Na deficiência de Cu, em *Beta vulgaris* L., a taxa de transporte de elétrons foi reduzida, sendo o PSII mais afetado que o PSI (DROPPA; TERRY; HORVATH, 1984). Em um estudo posterior, Droppa et al. (1987) constaram que em deficiência de Cu ocorreu uma modificação nas membranas dos tilacoides que pode ter prejudicado o aceptor do PSII (YRUELA, 2005). Além disso, sabe-se que plantas de *Pisum sativum* L. em deficiência de Cu apresentam alteração na composição de ácidos graxos, tornando-os mais saturados, bem como apresentam alteração na composição de carotenoides e redução no conteúdo de pigmentos fotossintéticos (AYALA et al., 1992).

Com os estudos de mutantes, pode-se obter mais informações sobre os elementos minerais e sua homeostase. Os mutantes *paa1* e *paa2* possuem perda de função nos transportadores AtHMA6 e AtHMA8, respectivamente (ABDEL-GHANY et al., 2005; MIGOCKA, 2015; SHIKANAI et al., 2003). Sugere-se que ambos realizam em sequência o transporte de Cu nos cloroplastos, sendo o PAA1/AtHMA6 responsável pelo transporte ao estroma e o PAA2/AtHMA8 pelo transporte ao lúmen dos tilacoides (ABDEL-GHANY et al., 2005; SHIKANAI et al., 2003). Nesse sentido, em plantas mutantes *paa1* e *paa2* em decorrência de uma menor concentração de Cu nos cloroplastos e no lúmen dos tilacoides, respectivamente, pode-se observar que em ambas a taxa de transporte de elétrons na fotoquímica foi menor e

apresentaram um fenótipo com alta dissipação de fluorescência, sendo o *paal* o mais prejudicado (ABDEL-GHANY et al., 2005).

Uma menor concentração de Cu nos cloroplastos pode implicar na redução na atividade da CuZnSOD e da plastocianina, sendo a forma holoplastocianina encontrada em menor quantidade, e ainda, em um menor conteúdo de clorofila (ABDEL-GHANY et al., 2005; SHIKANAI et al., 2003). Assim, a deficiência de Cu está muito relacionada com redução no conteúdo de proteínas importantes no metabolismo vegetal, desse modo alterando os processos metabólicos, o que pode desencadear em maior conteúdo de espécies reativas de oxigênio e, por consequência, um estresse oxidativo (PEÑARRUBIA et al., 2015; RAVET; PILON, 2013; YRUELA, 2013).

Em condições de deficiência de Cu no tecido vegetal há um mecanismo de economia de Cu, o qual foi descrito em *Arabidopsis thaliana* (BURKHEAD et al., 2009). Nesse mecanismo as plantas priorizam Cu para proteínas que participam de processos fundamentais, como a fotossíntese e respiração, nesse caso, alocando o Cu para plastocianina e citocromo *c* oxidase, respectivamente (ABDEL-GHANY; PILON, 2008; BURKHEAD et al., 2009; PEÑARRUBIA et al., 2010). Em contrapartida, reduz o consumo de Cu em proteínas consideradas menos essenciais (CuZnSODs, lacases, plantacianinas, etc.), parece que essa regulação ocorre principalmente em nível pós-transcricional via miRNAs (ABDEL-GHANY; PILON, 2008; BURKHEAD et al., 2009; PEÑARRUBIA et al., 2010; YAMASAKI et al., 2009). Além disso, associado a esse mecanismo, algumas proteínas cúpricas podem ser substituídas por outras equivalentes, porém dependentes de outros metais como cofatores, um exemplo são as CuZnSODs que podem ser substituídas pela SOD dependente de Fe (FeSOD) (ABDEL-GHANY et al., 2005; ABDEL-GHANY; PILON, 2008; BURKHEAD et al., 2009).

Em *Arabidopsis*, o regulador central desse mecanismo e, por consequência, o principal da homeostase de Cu nas células é o fator de transcrição SPL7 (*Squamosa promoter binding like protein 7*) (YAMASAKI et al., 2009). *Squamosa promoter binding proteins* (SBP) consiste em uma família de fatores de transcrição, na qual existem 16 genes codificantes para diferentes *SBP-Like* (SPL) proteínas em *Arabidopsis* (YAMASAKI et al., 2009), dentre essas está o SPL7. Para ativar o início da transcrição nos genes alvos, o SPL7 precisa se ligar nos elementos de resposta ao Cu (CuRE) na região do promotor, mais especificamente na sequência denominada motivo GTAC (YAMASAKI et al., 2009).

O SPL7 é constitutivamente expresso, sendo assim, sua expressão independe da concentração de Cu de maneira significativa (YAMASAKI et al., 2009). A maior concentração de transcritos de SPL7 ocorre principalmente em raízes, entretanto, também está presente em

outros órgãos vegetais como caule, folhas e flores de *Arabidopsis thaliana* (YAMASAKI et al., 2009). Em deficiência de Cu, parece que o SPL7 pode atuar em conjunto com o fator de transcrição CITF1 (Fator de transcrição induzido pela deficiência de Cu) para realizar o transporte de Cu aos órgãos reprodutivos, como as anteras (YAN et al., 2017). Além disso, em resposta a deficiência de Cu, o SPL7 pode ativar a expressão de genes relacionados com a absorção de Cu, como *COPT1* e *COPT2* em raízes de *Arabidopsis*, bem como de outras proteínas envolvidas no transporte de Cu e chaperonas (YAMASAKI et al., 2009). O SPL7 também atua na homeostase de Cu através de miRNAs, assim regula indiretamente proteínas cúpricas (YAMASAKI et al., 2009).

Os microRNAs (miRNAs) são pequenas moléculas de RNAs com cerca de 21 nucleotídeos não codificantes para proteínas (ABDEL-GHANY; PILON, 2008). Geralmente regulam proteínas cúpricas através da quebra dos transcritos (BURKHEAD et al., 2009). Pilon (2017) sugere que os miRNAs podem ser uma importante maneira de regular a distribuição de Cu local e talvez sistêmica, disponibilizando mais Cu através da redução de transcritos de proteínas alvos, e ainda, podem atuar na sinalização e na comunicação entre células próximas. Em resposta à deficiência de Cu, em *A. thaliana*, os miRNA397, miRNA398, miRNA408 e miRNA857 são regulados pelo SPL7 (ABDEL-GHANY; PILON, 2008; BERNAL et al., 2012; ZHANG; LI, 2013; YAMASAKI et al., 2009).

No genoma de *Arabidopsis* há dois genes que codificam para o miRNA397, sendo *MIRNA397a* e *MIRNA397b* (ABDEL-GHANY; PILON, 2008). A maior expressão de miRNA397 se encontra no ápice da parte aérea, no caule e em sementes, especialmente nos tecidos vasculares do caule e no meristema apical, e ainda, sabe-se que o *miRNA397b* apresenta uma expressão relativamente superior ao *miRNA397a* nos tecidos vegetais (WANG et al., 2014). Esses miRNAs têm como alvos especificamente lacases (*LAC2*, *LAC4* e *LAC17*) e a regulação de seus alvos ocorre em nível pós-transcricional (ABDEL-GHANY; PILON, 2008; YAMASAKI et al., 2009; WANG et al., 2014). Sugere-se que os miRNA397 apresentam funções específicas em plantas vasculares, como na regulação da biossíntese de lignina e no rendimento de sementes (WANG et al., 2014). Em arroz, sabe-se que o miRNA397 reduz o conteúdo de OsLAC, aumentando a sinalização de brassinosteroides, o que poderá refletir no aumento de rendimento de grãos (ZHANG et al., 2013).

A família miRNA398 possui três membros: *miRNA398a*, *miRNA398b* e *miRNA398c* (YAMASAKI et al., 2007). Apenas os genes *miRNA398b* e *miRNA398c* possuem sua transcrição ativada pelo SPL7 em resposta a deficiência de Cu (YAMASAKI et al., 2009). Maiores níveis de transcritos de miRNA398 podem ser encontrados em folhas, caule e raízes

(SUNKAR; KAPOOR; ZHU, 2006). Esse miRNA tem como alvos as proteínas *CSD1*, *CSD2* e *COX5b-1*, sendo o último um dos dois genes para a subunidade 5b que se liga ao Zn da proteína citocromo *c* oxidase (YAMASAKI et al., 2007; YAMASAKI et al., 2009). Esse miRNA promove a redução de *CSD1* e *CSD2* via degradação dos respectivos mRNAs com aumento de sua expressão (ABDEL-GHANY; PILON, 2008).

O miRNA408 é codificado por um único gene em *Arabidopsis* e constatou-se que sua regulação pelo SPL7 em nível transcricional é dependente das concentrações de Cu (ZHANG; LI, 2013), sendo induzido na deficiência de Cu (ABDEL-GHANY; PILON, 2008; YAMASAKI et al., 2009). Os principais alvos desse miRNA são os genes *LAC13* e *ARPN* (plantacianina) (ABDEL-GHANY; PILON, 2008; ZHANG; LI, 2013).

Por fim, o miRNA857 parece estar presente apenas em três espécies vegetais: *Arabidopsis thaliana*, *Arabidopsis lyrata* e *Citrus sinensis* (ZHAO et al., 2015), sendo codificado por um gene (ABDEL-GHANY; PILON, 2008). Esse miRNA, encontra-se nos tecidos vasculares de plântulas e se observou que a regulação negativa pós-transcricional de seu alvo (*LAC7*) pode implicar em redução do crescimento secundário de tecidos vasculares, o que pode afetar a quantidade de lignina na parede celular de células do xilema em *Arabidopsis* (ABDEL-GHANY; PILON, 2008; ZHAO et al., 2015).

De acordo com Pilon (2017) existem muitos estudos de plantas submetidas a diferentes estresses abióticos que estão relacionados a alterações na expressão de miRNAs responsáveis por regular proteínas cúpricas. Pilon (2017) observou que quando os tratamentos resultaram em um menor crescimento e desenvolvimento vegetal, houve uma redução na expressão nos miRNAs, o que pode estar associado a um acúmulo de Cu e isso poderia estar inativando o SPL7. Já nos tratamentos que alteraram a absorção de Cu ou afetaram a concentração que chega na parte aérea, verificou-se um aumento na expressão de miRNAs, os quais poderiam estar atuando no mecanismo de economia de Cu (PILON, 2017). Dessa forma, parece que a concentração de Cu permite ativar ou inativar o SPL7 (PILON, 2017; YAMASAKI et al., 2009).

2.3 TOXIDEZ DE COBRE EM PLANTAS

O Cu em nível tóxico no solo pode ocorrer naturalmente dependendo do material de origem, bem como por fatores antrópicos como a mineração, aplicação em longo prazo de fungicidas cúpricos, sucessivas aplicações de dejetos líquidos de suínos, atividades industriais e urbanas, entre outros (ADREES et al., 2015; KABATA-PENDIAS, 2011; YRUELA, 2005;

YRUELA, 2009). No entanto, os efeitos tóxicos do Cu às plantas dependem da sua solubilidade e disponibilidade no ambiente de cultivo (ADREES et al., 2015).

Tóth et al. (2016) mostram como um valor limite a concentração de Cu de 100 mg kg⁻¹ nos solos agricultáveis da União Europeia, ainda, considerando os riscos à saúde humana e ecológicos se determinou as concentrações de Cu nos solos de 150 mg kg⁻¹ e 200 mg kg⁻¹ como sendo os valores de orientação baixo e alto, respectivamente (BRUNETTO et al., 2016). Luo et al. (2003) observaram uma concentração de Cu de 158 mg kg⁻¹ na camada superficial de solo (10 cm) irrigado, o qual era proveniente de uma área irrigada com água poluída com Cu na China. Visto que uma concentração no solo de 100 mg kg⁻¹ já implica em diminuição na matéria seca de raízes e diminuição de 10% no rendimento de grãos em arroz (XU et al., 2006). Ainda, em uma concentração de Cu no solo de 300-500 mg kg⁻¹ há uma diminuição da metade do rendimento de grãos (XU et al., 2006). Além disso, os mesmos autores observaram que uma concentração de 300-500 mg kg⁻¹ de Cu no solo ou acima já afetam drasticamente o crescimento de plantas de arroz.

Algumas espécies conseguem manter seu crescimento e desenvolvimento normalmente em áreas com nível tóxico de metais no solo, e ainda, podem acumular maiores quantidades de metais em seus tecidos (YRUELA, 2009). Por exemplo, a espécie *Elsholtzia splendens* não apresentou alteração em seu crescimento e desenvolvimento em um solo contendo 80 mg kg⁻¹ de Cu disponível, sendo a concentração total de Cu no solo de 1000 mg kg⁻¹ (JIANG; YANG; HE, 2004). Os mesmos autores observaram que essa espécie acumulou, em um experimento em casa de vegetação, uma concentração de Cu de até 1700 mg kg⁻¹ nas raízes e 10 mg kg⁻¹ na parte aérea. Porém, em condições de campo a concentração de Cu encontrada nas raízes foi de até 1260 mg kg⁻¹, já na parte aérea foi de 250 mg kg⁻¹ aos 70 dias e 50 mg kg⁻¹ aos 170 dias de cultivo, possivelmente devido a um efeito de diluição (JIANG; YANG; HE, 2004). Em *Avena sativa*, observou-se uma concentração de Cu de 170 mg kg⁻¹ de biomassa de parte aérea em plantas cultivadas em solo contaminado por mineração contendo 576 mg kg⁻¹ de Cu (ANDREAZZA et al., 2010).

Entretanto, uma concentração de Cu de 20 µg g⁻¹ ou acima na matéria seca dos tecidos já pode causar problemas no metabolismo na maioria das espécies vegetais (BURKHEAD et al., 2009; MARSCHNER, 1995). No entanto, a toxidez ao Cu varia consideravelmente entre espécies (BURKHEAD et al., 2009). Sharma et al. (2012) complementam que as respostas das plantas aos metais podem variar também de acordo com o metal em questão, sua concentração no tecido, bem como com as fases do desenvolvimento.

Sintomas descritos na literatura associados à toxidez ao Cu são clorose nos tecidos verdes das plantas e necrose, alterações na estrutura e composição da membrana dos tilacoides, alteração no alongamento e até inibição do crescimento tanto de raiz quanto de parte aérea, por consequência pode refletir em redução na biomassa e menor rendimento da cultura (ADREES et al., 2015; BURKHEAD et al., 2009; MARSCHNER, 2012; YRUELA, 2005; YRUELA, 2009). De acordo com a revisão de Yruela (2009), esses sintomas podem ser devido a diferentes fatores, como a propriedade do Cu de se ligar a grupos sulfidril de proteínas, o que pode alterar a atividade enzimática ou interferir em outras funções da proteína através da mudança na estrutura; o excesso de Cu pode dificultar a absorção de outros nutrientes e também causar problemas no transporte celular, bem como pode desencadear danos em diferentes partes nas células devido ao estresse oxidativo.

Abdel-Ghany et al. (2005), em estudo com *Arabidopsis thaliana*, observaram que em concentração de Cu considerada tóxica às plantas (50 μM) houve redução do conteúdo de clorofila e de plastocianina, possivelmente devido danos às membranas dos tilacoides, e ainda ocorreu a redução do crescimento vegetal. Outros estudos comentam que a redução no conteúdo de clorofila pode ser atribuída ao fato do Cu^{2+} em excesso, assim como outros metais pesados, poder substituir o Mg^{2+} da estrutura da clorofila (KÜPPER et al., 2003; YRUELA, 2009). O menor conteúdo de clorofila também pode estar associado a um antagonismo entre os elementos Fe e Cu, levando a uma menor concentração de Fe nas folhas, por consequência, além da redução da clorofila, o PSII se torna mais suscetível à fotoinibição (PÄTSIKKÄ et al., 2002; YRUELA, 2009). E ainda, parece que as consequências no metabolismo fotossintético refletem em maior produção de EROs (SHARMA et al., 2012).

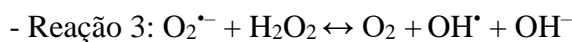
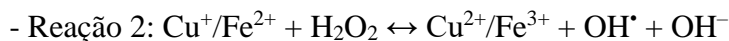
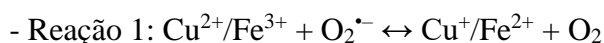
Em condições normais a maioria das células possuem a capacidade de produzir e detoxificar EROs, como o ânion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), oxigênio singleto ($^1\text{O}_2$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxil (OH^{\cdot}), mantendo os níveis de EROs intracelulares mais baixos possíveis, já que são subprodutos da redução do O_2 com origem em atividades de transporte de elétrons, especialmente, nos cloroplastos, mitocôndrias e membrana plasmática (GILL; TUTEJA, 2010; SHARMA et al., 2012; YRUELA, 2005). Uma forma de redução da concentração de EROs é pela ação de metaloenzimas que fazem parte do sistema antioxidante das plantas, como a FeSOD e a CuZnSOD, as quais catalisam a dismutação de $\text{O}_2^{\cdot-}$ para O_2 e H_2O_2 , e ainda enzimas como as peroxidases e catalases são responsáveis por catalisar a formação de H_2O_2 em H_2O (SHARMA et al., 2012; TEWARI; KUMAR; SHARMA, 2006).

No entanto, sob condições de estresse, como maiores concentrações de metais, entre eles o Cu, há uma rápida produção de maiores quantidades de EROs (YRUELA, 2005). Assim,

o excesso de íons livres de Cu pode induzir ao estresse oxidativo nas células através de um desbalanço entre a concentração de EROs e o sistema antioxidante vegetal (SHARMA et al., 2012; SHINAKAI et al., 2003; YRUELA, 2005).

Nesse sentido, a propriedade redox do Cu, como comentado anteriormente, permite sua participação em reações de transferência de elétrons, entretanto também pode contribuir para sua toxicidade aos organismos vivos (BURKHEAD et al., 2009; YRUELA, 2005). De acordo com Ravet e Pilon (2013), metais de transição, como o Cu e o Fe livres no citoplasma, podem participar de reações do ciclo de Haber-Weiss, assim a toxicidade desses metais decorre, especialmente, pela formação do altamente reativo radical hidroxil (OH^\bullet). Acredita-se que o OH^\bullet é o mais danoso das EROs, pois é um dos principais responsáveis pelas modificações irreversíveis em componentes celulares, como proteínas, DNA, ácidos orgânicos, carboidratos e lipídeos (GILL; TUTEJA, 2010; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1984).

Nas reações do ciclo de Haber-Weiss descritas abaixo, pode-se perceber que na “reação 1” ocorre a redução do oxigênio molecular com isso o metal passa do estado oxidado para o reduzido (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1984; RAVET; PILON, 2013). Na sequência, na “reação 2” os metais, Cu ou Fe, em presença de H_2O_2 , catalisam a formação do OH^\bullet , essa reação também é conhecida como Fenton quando o Fe é o catalisador (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1984; RAVET; PILON, 2013). Por fim, em condições de estresse há um acúmulo de $\text{O}_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 nas células e esses são substratos da “reação 3” que também desencadeia na formação do OH^\bullet (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1984; RAVET; PILON, 2013).



Thounaojam et al. (2012) observaram em plantas de arroz, submetidas ao excesso de Cu (100 μM de Cu), diminuição em parâmetros de crescimento, como menor comprimento de raízes e parte aérea, bem como menor matéria fresca, sendo as raízes mais prejudicadas que a parte aérea (THOUNAOJAM et al., 2012). Além disso, o excesso de Cu pode induzir ao estresse oxidativo em plantas de arroz, visto uma maior concentração de EROs e MDA (malondialdeído) nas raízes e parte aérea (THOUNAOJAM et al., 2012). Ainda, no mesmo estudo os autores observaram que plantas responderam ao excesso de Cu através de uma maior atividade de enzimas antioxidantes e de um maior conteúdo de componentes não enzimáticos

tanto em raízes como na parte aérea, os quais fazem parte do sistema de defesa vegetal, como ascorbato, glutatona e prolina (THOUNAOJAM et al., 2012).

Em vista de evitar potenciais efeitos tóxicos de metais pesados, as plantas apresentam uma inerente tolerância aos metais e em sua maioria as espécies apresentam alguns mecanismos de tolerância em comum (CLEMENS, 2001). Entretanto, esses mecanismos e as respostas aos metais podem variar entre espécies e até mesmo dentro da mesma espécie, com a concentração do metal e com o tempo de exposição (YRUELA, 2009). E ainda, estão muito relacionados em como o excesso de metais, como o Cu, afetam a expressão gênica (SUDO et al., 2008; YRUELA, 2009).

Sudo et al. (2008) através do microarranjo de DNA e RT-PCR quantificaram a expressão gênica em folhas de *Oryza sativa*, submetendo a diferentes concentrações de Cu (0,3; 10; 45; 130 μ M), a fim de obter a resposta de genes ao estresse por Cu. Nesse estudo, verificou-se que 305 genes foram responsivos ao Cu, dentre esses, os genes com maior expressão em excesso de Cu foram os associados à defesa por estresse, especialmente àqueles envolvidos na biossíntese de flavonoides, fitoalexina e lignina. Alguns genes relacionados a proteínas cúpricas também foram regulados pelo excesso de Cu, como os genes codificantes para oxidases contendo Cu, por exemplo, a ascorbato oxidase (SUDO et al., 2008). Essas proteínas cúpricas que aumentam a expressão em maiores concentrações de Cu podem atuar na redução da quantidade de íons de Cu livre no citoplasma e em locais subcelulares (SUDO et al., 2008). Nesse sentido, as CuZnSOD também podem estar associadas a essa função (ABDEL-GHANY et al., 2005). Já os genes relacionados com o processo fotossintético e ao transporte celular apresentaram menor expressão nessa condição, por exemplo se observou uma menor expressão de plastocianina, ao mesmo tempo houve uma redução nas taxas de transpiração e de fotossíntese em 130 μ M de Cu, o que demonstra que em condições de excesso de Cu também ocorrem alterações fisiológicas (SUDO et al., 2008).

De acordo com Clemens (2001) muitos mecanismos de tolerância implicam na manutenção da concentração adequada de metais no citoplasma, em vista de evitar possíveis efeitos tóxicos (CLEMENS, 2001). Dessa forma, pode ocorrer a regulação de transportadores de influxo em células radiculares, ligação com quelantes e chaperonas, regulação de transportadores de efluxo do citoplasma, bem como aumento do sequestro do Cu que se dá a partir da compartimentalização no vacúolo (CLEMENS, 2001; YRUELA, 2009). Algumas proteínas cúpricas também podem contribuir na tolerância ao excesso de Cu. Nesse sentido, observou-se que a plastocianina, codificada pelo gene *SsPETE2*, contribui na tolerância ao estresse oxidativo em *Suaeda salsa*, visto sua habilidade de se ligar ao Cu (ZHOU et al., 2018).

O armazenamento de metais no apoplasto ou em células especializadas, como células epidérmicas e tricomas, também pode contribuir na redução da toxidez às plantas (YRUELA, 2009). Além disso, dentre os mecanismos de tolerância, a excreção de exsudatos como ácidos orgânicos, carboidratos ou proteínas pelas raízes pode dificultar a absorção de metais através da formação de complexos nas raízes (MARSCHNER, 2012; YRUELA, 2009).

Alguns transportadores de membrana já caracterizados funcionalmente foram relacionados com aumento de tolerância ao Cu. Um exemplo é o transportador em arroz localizado no tonoplasto de células do periciclo, o OsHMA4, o qual pode permitir maior tolerância ao Cu em plantas, pois o sequestro de Cu no vacúolo das raízes implica numa redução na concentração de Cu na parte aérea (HUANG et al., 2016). Por consequência, em plantas mutantes *oshma4*, observou-se menor altura e menor alongamento radicular relativa em relação ao tipo selvagem, entretanto, sua indução depende de um tempo longo de exposição ao Cu (HUANG et al., 2016). Os transportadores de *Cucumis sativus* localizados no tonoplasto, CsHMA5.1 e CsHMA5.2, também parecem aumentar a tolerância ao Cu em leveduras (HUANG et al., 2016; MIGOCKA et al., 2015). O transportador AtHMA5, em *Arabidopsis thaliana*, também está associado ao aumento de tolerância ao Cu, parece que possui papel na detoxificação desse metal em raízes (ANDRÉS-COLÁS et al., 2006). A partir de 5 μ M de Cu se verificou redução no comprimento radicular em mutantes *athma5* em relação ao tipo selvagem, entretanto, ainda não se sabe a localização subcelular desse transportador (ANDRÉS-COLÁS et al., 2006).

Visto que os metais podem se ligar a quelantes e chaperonas, essa é outra maneira de reduzir a quantidade de íons livres no citoplasma que poderiam causar danos às células (YRUELA, 2009). Os quelantes, como as metalotioneínas, ácidos orgânicos e aminoácidos, atuam como agentes tamponantes do Cu no citoplasma (CLEMENS, 2001; SUDO et al., 2008). Já as chaperonas contribuem na rede de transporte celular, sendo específicas a determinados transportadores e proteínas que requerem Cu (CLEMENS, 2001).

2.4 TRANSPORTE DE COBRE

2.4.1 Famílias de transportadores de cobre

Para manutenção da homeostase de Cu nas células é necessário regular a absorção, armazenamento e distribuição desse elemento nas células e tecidos, para isso diferentes transportadores estão envolvidos (ANDRÉS-COLÁS et al., 2006; DENG et al., 2013). De

acordo com Printz et al. (2016), até o momento as famílias de transportadores que foram relacionadas com o transporte de Cu são: COPT (SANCENÓN et al., 2003; SANCENÓN et al., 2004; YUAN et al., 2011), ZIP (WINTZ et al., 2003), YSL (CURIE et al., 2001) e HMA (BURKHEAD et al., 2009; DENG et al., 2013; WILLIAMS; MILLS, 2005).

2.4.1.1 Família CTR/COPT

Os membros da família CTR/COPT (*COPper Transporter protein*) apresentam características conservadas, como três domínios transmembranas (TMD1-3), uma região extracelular N-terminal rica em metionina e/ou histidina e um motivo de assinatura $Mx_3Mx_{12}Gx_3G$ embebido nos TMD2 e TMD3 (PUIG, 2014). Essas características são importantes para desempenhar o transporte de Cu^+ , visto que parece que os motivos ricos em metionina facilitam o transporte do íon através do poro em direção ao citosol por realizarem uma primeira ligação com o metal (PEÑARRUBIA et al., 2010; PUIG, 2014). Os transportadores CTR-like/COPT em plantas parecem ser de alta afinidade e possuir especificidade por Cu^+ (PEÑARRUBIA et al., 2010). Em *Arabidopsis thaliana* há seis genes que codificam membros dessa família (*AtCOPT1-AtCOPT6*) (SANCENÓN et al., 2003; SANCENÓN et al., 2004; PUIG, 2014), enquanto que em arroz (*Oryza sativa*) há sete membros (*OsCOPT1-OsCOPT7*) (YUAN et al., 2011).

2.4.1.2 Família P_{1B} -ATPases/ HMA

P-type ATPases correspondem a uma grande família de proteínas presente em procariotos e eucariotos (MØLLER; JUUL; MAIRE, 1996). O nome “P-type” é devido a produção de um composto fosforilado intermediário durante um ciclo de reação que está envolvido (AXELSEN; PALMGREN, 1998). As diferentes especificidades de seus ligantes lhes permitem realizar diferentes funções (AXELSEN; PALMGREN, 1998). De acordo com a especificidade de seu substrato as P-type ATPases foram divididas em cinco subfamílias (AXELSEN; PALMGREN, 1998). Dentre essas, as Cu-ATPases fazem parte da subfamília P_{1B} -ATPases (AXELSEN; PALMGREN, 1998; MIGOCKA, 2015). Os membros da P_{1B} -ATPases foram divididos em dois subgrupos: os envolvidos no transporte de Cu^+/Ag^+ e outros no transporte de $Zn^{2+}/Cádmio (Cd^{2+})/Cobalto (Co^{2+})/Chumbo (Pb^{2+})$ (AXELSEN; PALMGREN, 2001; DENG et al., 2013; WILLIAMS; MILLS, 2005).

As P-type ATPases utilizam a hidrólise do ATP como fonte de energia para transportar o cátion por uma membrana contra seu gradiente de concentração (LUTSENKO et al., 2007; MIGOCKA, 2015). Para isso, algumas sequências de aminoácidos específicas (motivos) são requeridas para a fosforilação e para permitir a seletividade ao cátion a ser transportado (MIGOCKA, 2015). Uma etapa importante para o transporte é a transferência de um fosfato do ATP para o aminoácido ácido aspártico do motivo conservado DKTG, formando um composto fosforilado intermediário (LUTSENKO et al., 2007; MIGOCKA, 2015). Porém, para que essa etapa ocorra é necessário a ligação do cátion em uma região específica da proteína (LUTSENKO et al., 2007).

Assim, as Cu-ATPases são organizadas estruturalmente para que seja possível o transporte do Cu (LUTSENKO et al., 2007). Desse modo, possuem características conservadas como possíveis oito domínios transmembranas, o motivo CPC(x)₆P no sexto domínio transmembrana, domínio de ligação de metais (MBDs) na região N- terminal, um sítio de fosforilação (DKTGT), entre outras (ARGÜELLO, 2003; WILLIAMS; MILLS, 2005). Por exemplo, o domínio de associação de metais pesados (HMA-*Heavy Metal Associated*) apresenta uma sequência comum de aminoácidos entre os transportadores dessa subfamília que inclui o motivo MxCxxC na região N-terminal (WILLIAMS; MILLS, 2005).

As Cu-ATPases se localizam em diferentes tecidos vegetais e possuem distintas funções fisiológicas (WILLIAMS; MILLS, 2005), já foram relatadas por contribuírem no transporte intracelular entre organelas e citosol, no efluxo de Cu para o meio extracelular, detoxificação celular, etc (MIGOCKA, 2015). Em *Arabidopsis thaliana* há oito membros de P_{1B}-ATPases (AtHMA1-AtHMA8). Em contrapartida, há nove membros em *Oryza sativa* (OsHMA1-OsHMA9), porém apenas cinco foram funcionalmente caracterizados (OsHMA2, OsHMA3, OsHMA4, OsHMA5 e OsHMA9) (Quadro 1).

2.4.1.3 Família ZIP

O nome da família ZRT/IRT-like proteínas (ZIP) é devido aos primeiros transportadores da família identificados (GUERINOT, 2000). Sabe-se que membros dessa família estão envolvidos no transporte de metais pesados, sendo alguns micronutrientes (MILNER et al., 2013).

No genoma de *Arabidopsis* existem 15 genes que codificam para membros da família ZIP (MILNER et al., 2013). Apenas *AtZIP2* e *AtZIP4* parecem ser regulados pela variação na concentração de Cu (DEL POZO; CAMBIAZO; GONZÁLEZ, 2010; MILNER et al., 2013;

WINTZ et al., 2003). Wintz et al. (2003) demonstraram que ambos restauraram o crescimento em leveduras deficiente no transporte de Cu, o que implica que podem transportar Cu em leveduras. Entretanto, recentemente, Milner et al. (2013) relataram que nenhum ZIP foi capaz de complementar o fenótipo de levedura deficiente na absorção de Cu, uma possível explicação seria as diferentes condições experimentais utilizadas nos estudos (PRINTZ et al., 2016). Em arroz, nenhum transportador dessa família foi relacionado ao transporte de Cu até o momento.

2.4.1.4 Família YSL

Os transportadores YSL (*Yellow Stripe-like*) pertencem à família de transportadores de oligopeptídeos (OPT), a qual está relacionada com o transporte de tri-, tetra-, penta- e hexapeptídeos em plantas, fungos, bactérias e arqueias (CURIE et al., 2009; YEN; TSENG; SAIER, 2001). O nome da família teve origem devido o mutante com perda de função no gene *ZmYSL1* apresentar um fenótipo com listras amarelas, sendo o *ZmYSL1* o primeiro membro da família descrito (CURIE et al., 2001). Sugere-se que proteínas YSL transportem metais complexados a nicotianamina (NA) e fitosideróforos (PS) (CURIE et al., 2001; CURIE et al., 2009). De acordo com Curie et al. (2009), em arroz há 18 genes que codificam para transportadores dessa família, até então apenas um membro foi relacionado ao transporte de Cu (ZHENG et al., 2012).

2.4.2 Transportadores de cobre em arroz

Muitos transportadores integrais de membrana para o Cu já foram funcionalmente caracterizados na literatura com o auxílio de plantas mutantes e sistemas heterólogos, como complementação funcional em leveduras, por exemplo. Visto que plantas com mutação em um gene específico auxiliam na compreensão das funções fisiológicas em que tal gene está envolvido (LEE et al., 2012). Em arroz, já foram caracterizados alguns transportadores de Cu (Quadro 1).

Como comentado anteriormente a família COPT apresenta sete membros em arroz, porém nenhum foi caracterizado funcionalmente ainda (Quadro 1). Além disso, não há informação na literatura de plantas de arroz mutantes para os genes *OsCOPT*. Sugere-se que todos os membros COPTs em arroz estão localizados na membrana plasmática (Quadro 1) (YUAN et al., 2011). Em arroz, até o momento os membros foram estudados a partir da complementação de fenótipo da levedura *Saccharomyces cerevisiae* com mutação para

absorção de Cu (YUAN et al., 2010; YUAN et al., 2011). Além disso, foram realizados alguns estudos para compreender a possível localização subcelular desses transportadores e os níveis de expressão gênica em diferentes tecidos em arroz (YUAN et al., 2011).

Os membros *OsCOPT1*, *OsCOPT5* e *OsCOPT7* apresentam indução da expressão em deficiência de Cu tanto nos tecidos das raízes quanto de parte aérea, já o *OsCOPT6* apenas nos tecidos de parte aérea (YUAN et al., 2010; YUAN et al., 2011). Os membros *OsCOPT1*, *OsCOPT2*, *OsCOPT3*, *OsCOPT4*, *OsCOPT5* e *OsCOPT7* apresentam supressão da expressão em excesso de Cu nos tecidos de raízes e de parte aérea, já o *OsCOPT6* apenas nos tecidos de parte aérea (YUAN et al., 2010; YUAN et al., 2011). Além disso, metais como Fe, Mn e Zn podem influenciar diferentemente na expressão dos genes codificantes para proteínas COPT nos tecidos de parte aérea e de raízes (YUAN et al., 2011), como pode ser observado no Quadro 1. Os membros *OsCOPT1* e *OsCOPT5* podem atuar em conjunto com a proteína XA13 para realizar o transporte de Cu (YUAN et al., 2010). Observou-se que *OsCOPT1* e *OsCOPT5* apresentam indução da expressão pela presença da bactéria PXO99 (YUAN et al., 2010; YUAN et al., 2011).

Os membros *OsCOPT2*, *OsCOPT3* e *OsCOPT4* precisam interagir com o *OsCOPT6* para realizar um transporte eficiente de Cu, exceto em raízes devido não haver expressão de *OsCOPT6* em raízes (YUAN et al., 2011). Parece que o *OsCOPT6* apresenta papel como cofator para ajudar na localização desses transportadores na membrana plasmática (YUAN et al., 2011). O *OsCOPT6* parece ser um transportador de baixa afinidade para o Cu quando expresso sozinho (YUAN et al., 2011). Dentre os membros COPTs em arroz, parece que apenas o *OsCOPT7* não se associa a outra proteína para realizar o transporte de Cu, pois quando *OsCOPT7* foi expresso sozinho mostrou complementação eficiente do fenótipo da levedura mutante para o transporte de Cu (YUAN et al., 2011).

Análises filogenéticas demonstram que os membros *OsCOPT6* e *OsCOPT7* são mais relacionados ao transportador *AtCOPT5* de *Arabidopsis thaliana* (YUAN et al., 2011). Em *A. thaliana*, o *AtCOPT5* localiza-se nos compartimentos pré-vacuolares e parece contribuir no efluxo de Cu de locais de armazenamento nas raízes para o Cu ser transportado à parte aérea em deficiência de Cu (GARCIA-MOLINA et al., 2011; PUIG, 2014).

Já os membros *OsCOPT1* ao *OsCOPT5* parecem ser mais relacionados com os transportadores *AtCOPT1* ao *AtCOPT4* em *A. thaliana* (YUAN et al., 2011). O transportador *AtCOPT1* foi o primeiro membro da família COPT caracterizado funcionalmente em *A. thaliana* (KAMPFENKEL et al., 1995, SANCENÓN et al., 2004). Esse transportador parece estar envolvido na aquisição de Cu pelas raízes, especialmente em condições de deficiência de

Cu, no crescimento radicular, bem como na redistribuição de Cu aos órgãos reprodutivos e, por consequência, parece ser importante para o desenvolvimento de pólen (KAMPFENKEL et al., 1995, PUIG, 2014; SANCENÓN et al., 2004). Já o AtCOPT2 tem papel na aquisição e distribuição de Cu, ainda, sugere-se contribuir na homeostase de Cu e Fe e no metabolismo do fosfato (PEREA-GARCÍA et al., 2013; PUIG, 2014; SANCENÓN et al., 2003). Os transportadores AtCOPT3 e AtCOPT4 ainda não foram caracterizados funcionalmente. No entanto, o AtCOPT4 diferencia-se dos demais membros por não apresentar resíduos de metionina e motivos essenciais que possibilitam o transporte de Cu (PUIG, 2014; SANCENÓN et al., 2003). Assim, sugere-se que não esteja envolvido de maneira direta no transporte de Cu (PUIG, 2014; SANCENÓN et al., 2003).

De acordo com análises filogenéticas, dos nove membros da subfamília P_{1B}-ATPases os transportadores OsHMA4, OsHMA5, OsHMA6, OsHMA7, OsHMA8 e OsHMA9 formam um grupo relacionado ao transporte de Cu (LEE et al., 2007). Dentre esses, os membros OsHMA6, OsHMA7 e OsHMA8 ainda não foram caracterizados funcionalmente em arroz (Quadro 1).

Sugere-se que o membro OsHMA4 transporta Cu para os vacúolos das raízes, o que resulta em uma menor concentração de Cu nos grãos (HUANG et al., 2016). A sua indução ocorre após um tempo longo de exposição ao Cu (HUANG et al., 2016). O membro em *Arabidopsis thaliana* com a sequência mais semelhante é o AtHMA5, tendo uma semelhança de sequência de 56,5% (HUANG et al., 2016). Ainda não foi descrita a localização subcelular do *AtHMA5*, porém observou-se que o mutante *athma5* apresentou maior sensibilidade ao Cu em relação ao tipo selvagem, sugerindo papel na detoxificação de Cu nas raízes (ANDRÉS-COLAS et al., 2006). Além disso, é muito induzido por excesso de Cu (ANDRÉS-COLAS et al., 2006).

Já o membro em arroz OsHMA5 apresenta 72% de semelhança de sequência com o AtHMA5 e 57% com o OsHMA4 (DENG et al., 2013). Sugere-se que o OsHMA5 transporta Cu ao xilema nos estágios vegetativos e reprodutivos (DENG et al., 2013). De acordo com o estudo de Deng et al. (2013), a concentração de Cu nos tecidos do mutante *oshma5* não difere da encontrada no seu tipo selvagem (DENG et al., 2013). No entanto, o mutante *oshma5* apresenta menor concentração de Cu na seiva do xilema e na parte aérea em relação ao seu tipo selvagem, por consequência apresenta maior concentração de Cu nas raízes (DENG et al., 2013). Sugere-se que o OsHMA5 é um transportador de membrana plasmática (DENG et al., 2013). Nos estágios vegetativos, localiza-se principalmente em raízes, especificamente nas células externas do periciclo (DENG et al., 2013). Já nos estágios reprodutivos, localiza-se na região dos feixes vasculares difusos do xilema no nó I, células de parênquima dos tecidos

vasculares do pedúnculo, casca e ráquis (DENG et al., 2013). Dessa forma, parece contribuir no transporte de Cu aos grãos, visto que o mutante *oshma5* apresenta menor concentração de Cu nos grãos em relação ao tipo selvagem (DENG et al., 2013). Sua expressão é induzida por excesso de Cu e parece que o Cu é transportado na sua forma reduzida (Cu^+) (DENG et al., 2013).

Parece que o OsHMA9 é um transportador de efluxo de Cu, especialmente na parte aérea (LEE et al., 2007). Além disso, apresenta uma maior expressão em folhas velhas do que em folhas jovens e há uma indução da expressão em maiores concentrações de Cu, Zn e Cd (LEE et al., 2007). Sugere-se ser um transportador de membrana plasmática e está presente principalmente nos tecidos vasculares (LEE et al., 2007). O membro em *Arabidopsis thaliana* mais relacionado é o AtHMA7/RAN1, o qual transporta Cu ao receptor de etileno ETR1 (HIRAYAMA et al., 1999; LEE et al., 2007).

Outro membro já descrito funcionalmente em arroz é o OsYSL16, o qual pertence à família YSL (ZHENG et al., 2012). O OsYSL16 possui função importante no transporte de Cu-NA no floema, dessa forma o elemento pode ser remobilizado de folhas velhas para tecidos em desenvolvimento, incluindo folhas jovens e sementes (ZHENG et al., 2012). Está presente, principalmente, nos tecidos vasculares de folhas e raízes (LEE et al., 2012; ZHENG et al., 2012). Além disso, esse transportador também parece estar envolvido na distribuição de Fe e ao superexpressar o gene *OsYSL16* em plantas, observou-se maior tolerância a deficiência de Fe (LEE et al., 2012).

Quadro 1 – Transportadores de Cu já caracterizados em *Oryza sativa*. Sendo, indução da expressão (↑exp.), redução da expressão (↓exp.), supressão da expressão (↓↓exp.) e desconhecido (?).

(continua)

Gene	Expressão nos órgãos e tecidos	Afinidade e localização subcelular	Íons transportados	Funções	Regulação da expressão gênica	Referências
COPT						
<i>OsCOPT1</i>	Principalmente em raízes e folhas (especialmente nas jovens); bainha; colmo; panícula.	<ul style="list-style-type: none"> •Baixa afinidade. •Parece ser de membrana plasmática. 	Cu ⁺ ?	<p>?</p> <p>OsCOPT1, OsCOPT5 e XA13 podem atuar juntos para realizar o transporte de Cu. Sugere-se estarem envolvidos na redistribuição de Cu.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • ↑exp. em ↓[Cu] nas raízes e parte aérea. • ↓↓exp. em ↑[Cu] nas raízes e parte aérea. • ↑exp. em ↓[Mn] e ↓[Zn] em raízes. • Pouco induzido em ↓[Fe] em raízes. • Xoo cepa (PXO99) ↑exp. 	Yuan et al. (2010); Yuan et al. (2011).
<i>OsCOPT2</i>	Principalmente na panícula e folhas (especialmente nas velhas); colmo; bainha; raízes.	<ul style="list-style-type: none"> • Sugere-se ser de baixa afinidade quando sozinho. • Parece ser de membrana plasmática. 	Cu ⁺ ?	<p>?</p> <p>OsCOPT2 parece atuar juntamente com OsCOPT6 para realizar o transporte eficiente de Cu, exceto em raízes.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • ↓↓exp. em ↑[Cu] nas raízes e parte aérea. • ↓[Mn] influencia na ↓↓exp em raízes. • ↑exp. em ↓[Fe] na parte aérea. • ↓↓exp. em ↓[Fe] em raízes. 	Yuan et al. (2011).

Quadro 1 – Transportadores de Cu já caracterizados em *Oryza sativa*. Sendo, indução da expressão (↑exp.), redução da expressão (↓exp.), supressão da expressão (↓↓exp.) e desconhecido (?).

(continuação)

Gene	Expressão nos órgãos e tecidos	Afinidade e localização subcelular	Íons transportados	Funções	Regulação da expressão gênica	Referências
<i>OsCOPT3</i>	Principalmente na panícula e folhas (especialmente nas velhas); colmo; bainha; raízes.	<ul style="list-style-type: none"> • Sugere-se ser de baixa afinidade quando sozinho. • Parece ser de membrana plasmática. 	Cu ⁺ ?	<p>?</p> <p><i>OsCOPT3</i> parece atuar juntamente com <i>OsCOPT6</i> para realizar o transporte eficiente de Cu, exceto em raízes.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • ↓↓exp. em ↑[Cu] nas raízes e parte aérea. • ↑exp. em ↓[Mn] na parte aérea. 	Yuan et al. (2011).
<i>OsCOPT4</i>	Principalmente em raízes, mas também em folhas (especialmente nas jovens); bainha; colmo; panícula.	<ul style="list-style-type: none"> • Sugere-se ser de baixa afinidade quando sozinho. • Parece ser de membrana plasmática. 	Cu ⁺ ?	<p>?</p> <p><i>OsCOPT4</i> parece atuar juntamente com <i>OsCOPT6</i> para realizar o transporte eficiente de Cu, exceto em raízes.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • ↓↓exp. em ↑[Cu] nas raízes e parte aérea. • ↓[Mn] e ↓[Zn] influenciam na ↓↓exp. em raízes. 	Yuan et al. (2011).

Quadro 1 – Transportadores de Cu já caracterizados em *Oryza sativa*. Sendo, indução da expressão (↑exp.), redução da expressão (↓exp.), supressão da expressão (↓↓exp.) e desconhecido (?).

(continuação)

Gene	Expressão nos órgãos e tecidos	Afinidade e localização subcelular	Íons transportados	Funções	Regulação da expressão gênica	Referências
<i>OsCOPT5</i>	Principalmente em raízes e folhas (especialmente nas jovens); bainha; colmo; panícula.	<ul style="list-style-type: none"> •Baixa afinidade. •Parece ser de membrana plasmática. 	Cu ⁺ ?	? OsCOPT1, OsCOPT5 e XA13 podem atuar juntos para realizar o transporte de Cu. Sugere-se estarem envolvidos na redistribuição de Cu.	<ul style="list-style-type: none"> •↑exp. em ↓[Cu] nas raízes e parte aérea. •↓↓exp. em ↑[Cu] nas raízes e parte aérea. •↑exp. em ↓[Zn] nas raízes. •↓[Fe] ↓↓exp. em raízes e ↑exp. na parte aérea. •Xoo cepa (PXO99) ↑exp. 	Yuan et al. (2010); Yuan et al. (2011).
<i>OsCOPT6</i>	Principalmente em folhas (expressão constitutiva em plantas estágio adulto, mas quando plântula apresenta baixa expressão); colmo; bainha; panícula; ausente em raízes.	<ul style="list-style-type: none"> •Sugere-se ser de baixa afinidade quando sozinho. •Parece ser de membrana plasmática. 	Cu ⁺ ?	? Parece que OsCOPT6 atua como cofator para ajudar na localização do OsCOPT2, OsCOPT3 ou OsCOPT4 na membrana plasmática.	<ul style="list-style-type: none"> •↑exp. em ↓[Cu] na parte aérea. •↑exp. em ↓[Fe] e ↓[Zn] na parte aérea. •↓↓exp. em ↑[Cu] na parte aérea. 	Yuan et al. (2011).

Quadro 1 – Transportadores de Cu já caracterizados em *Oryza sativa*. Sendo, indução da expressão (↑exp.), redução da expressão (↓exp.), supressão da expressão (↓↓exp.) e desconhecido (?).

(continuação)

Gene	Expressão nos órgãos e tecidos	Afinidade e localização subcelular	Íons transportados	Funções	Regulação da expressão gênica	Referências
<i>OsCOPT7</i>	Principalmente em raízes e folhas (especialmente nas velhas); bainha; colmo; panícula.	•Parece ser de membrana plasmática.	Cu ⁺ ?	? Parece realizar o transporte de Cu sem se associar a outra proteína.	<ul style="list-style-type: none"> •↑exp. em ↓[Cu] nas raízes e parte aérea. •↓↓exp. em ↑[Cu] nas raízes e parte aérea. •↑exp. em ↓[Zn], ↓[Fe] e ↓[Mn] na parte aérea. •↑exp. em ↓[Zn] em raízes. 	Yuan et al. (2011).
HMA						
<i>OsHMA4</i>	Principalmente em raízes do que em outros órgãos; especialmente nos tecidos vasculares do estelo e nas células do periciclo das zonas maduras da raiz.	•Tonoplasto.	Cu ⁺	Transporta Cu no vacúolo das raízes.	<ul style="list-style-type: none"> •↑exp. em ↑[Cu] em raízes em longo prazo. •Pouco induzido por Ag e Cd. •↓↓ por [Pb] e [Mn]. •↓exp. em ↓[Cu] e ↓[Fe]. •Não alterou a expressão significativamente pela maior concentração de Cu, Zn, Pb ou Cd (LEE et al., 2007). 	Huang et al. (2016); Lee et al. (2007).

Quadro 1 – Transportadores de Cu já caracterizados em *Oryza sativa*. Sendo, indução da expressão (↑exp.), redução da expressão (↓exp.), supressão da expressão (↓↓exp.) e desconhecido (?).

(continuação)

Gene	Expressão nos órgãos e tecidos	Afinidade e localização subcelular	Íons transportados	Funções	Regulação da expressão gênica	Referências
<i>OsHMA5</i>	Nos estágios vegetativos principalmente em raízes (especificamente nas células externas do periciclo das zonas maduras); nos estágios reprodutivos na região dos feixes vasculares difusos do xilema no nóI; células de parênquima dos tecidos vasculares do pedúnculo, casca e ráquis.	•Membrana plasmática.	Cu ⁺	Carregamento de Cu no xilema nos estágios vegetativos e reprodutivos (DENG et al., 2013). Sugere-se papel na detoxificação celular (LEE et al., 2007).	•↑exp. em ↑[Cu] (DENG et al., 2013). •↑exp. na presença de ↑[Cu], ↑[Zn], ↑[Pb] ou ↑[Cd] (LEE et al., 2007).	Deng et al. (2013); Lee et al. (2007).
<i>OsHMA6</i>	Principalmente em folhas do que em raízes; colmo.	?	Cu?	Sugere-se contribuir em certa tolerância a maior concentração de metais e função na detoxificação de metais.	•↑exp. na presença de ↑[Cu], ↑[Zn], ↑[Pb] ou ↑[Cd]; mas menos induzido por Cu que o <i>OsHMA9</i> .	Lee et al. (2007).
<i>OsHMA7</i>	Principalmente em folhas do que em raízes; sementes; colmo.	?	Cu?	?	•Não alterou a expressão significativamente pela maior concentração de Cu, Zn, Pb ou Cd.	Lee et al. (2007).

Quadro 1 – Transportadores de Cu já caracterizados em *Oryza sativa*. Sendo, indução da expressão (↑exp.), redução da expressão (↓exp.), supressão da expressão (↓↓exp.) e desconhecido (?).

(conclusão)

Gene	Expressão nos órgãos e tecidos	Afinidade e localização subcelular	Íons transportados	Funções	Regulação da expressão gênica	Referências
<i>OsHMA8</i>	Principalmente em folhas do que em raízes; colmo.	?	Cu	?	•Não alterou a expressão significativamente pela maior concentração de Cu, Zn, Pb ou Cd.	Lee et al. (2007).
<i>OsHMA9</i>	Durante crescimento vegetativo maior expressão em raízes do que em folhas; raiz seminal (principalmente no cilindro vascular, zona de diferenciação na região do córtex). Maior expressão em folhas maduras (tecidos vasculares; mesófilo; baixa nas células epidérmicas); bainha; espiguetas em desenvolvimento; anteras; estames; colmo.	•Membrana plasmática.	Cu	Efluxo de metais, principalmente na parte aérea. Sugere-se contribuir em certa tolerância a maior concentração de metais (Cu, Zn e Pb).	•↑exp. em ↑[Cu], ↑[Zn] e ↑[Cd].	Lee et al. (2007).
YSL						
<i>OsYSL16</i>	Raízes (especialmente nas zonas maduras); exoderme; estelo; tecidos vasculares da lâmina foliar; lema; pálea; (especialmente gluma); bainha; floema dos nós.	•Membrana plasmática.	Cu-NA	Atua no carregamento de Cu-NA no floema.	•Nas raízes ↓[Zn] e ↓[Fe] ↑exp. •Na parte aérea ↓[Fe] ↓exp e ↓[Zn] ↑exp. •Nas regiões basais ↓[Mn] e ↓[Cu] ↓exp.	Zheng et al. (2012).

2.4.3 Chaperonas envolvidas no transporte de Cu

Além de transportadores de membrana, a rede de transporte de Cu intracelular conta com pequenas proteínas solúveis, as chaperonas (BLABY-HAAS et al., 2014; PRINTZ et al., 2016). Essas proteínas são responsáveis por complexar o Cu e transportá-lo até o alvo, podendo ser, por exemplo, uma apoproteína específica ou uma proteína integral de membrana de uma organela, dessa forma, evitam o acúmulo de Cu livre no citoplasma e, por consequência, seus potenciais efeitos tóxicos (BLABY-HAAS et al., 2014; PRINTZ et al., 2016; SHIN; LO; YEH, 2012).

Em *Arabidopsis thaliana* já foram descritas algumas chaperonas que participam da rede de transporte de Cu, dentre essas, a chaperona CCS (Cu chaperona para SOD) que direciona o Cu^+ às isoformas da CuZnSOD (CSD1 e CSD2), sugere-se também haver uma interação entre essa chaperona e o transportador AtHMA8/PAA2 (BLABY-HAAS et al., 2014; TAPKEN et al., 2015); a chaperona PCH1 (Plastídeo chaperona 1) leva o Cu^+ para o transportador AtHMA6/PAA1 (BLABY-HAAS et al., 2014; TAPKEN et al., 2015); a ATX1 (Proteína antioxidante 1) é a chaperona que leva o Cu^+ às $\text{P}_{1\text{B}}$ -ATPases, por exemplo a RAN1 (AtHMA7) no retículo endoplasmático, e ainda, parece que a maioria das proteínas de endomembranas e do apoplasto tem o Cu^+ adicionado no retículo endoplasmático ou na parte trans do complexo de Golgi, assim utilizam a rota COPT-ATX1-RAN1 (PEÑARRUBIA et al., 2015; SHIN; LO; YEH, 2012).

2.4.4 Absorção de cobre

A absorção de Cu é considerada uma das principais etapas para a manutenção da homeostase desse elemento nas células (SANCENÓN et al., 2004; YRUELA, 2009). O mecanismo de absorção de Cu pelas raízes ainda não foi totalmente compreendido (RYAN et al., 2013). Porém, há evidências que em plantas, como as dicotiledôneas e não gramíneas, o processo de absorção e translocação de Cu dependem de reações redox (RYAN et al., 2013). Já em gramíneas, a partir do estudo com *Avena sativa*, parece que o processo de absorção e translocação dependem de mecanismos de complexação (RYAN et al., 2013).

Em *Arabidopsis thaliana*, os COPTs, em geral, são transportadores de alta afinidade para Cu na sua forma reduzida (Cu^+), os membros dessa família localizados na membrana plasmática e envolvidos no transporte de Cu^+ ao citoplasma são o COPT1, COPT2 e COPT6

(SANCENÓN et al., 2004; PUIG, 2014; PEÑARRUBIA et al., 2015). Sugere-se que o AtCOPT1 é o principal transportador de entrada de Cu nas células das raízes, visto que as linhagens mutantes para o *COPT1* apresentaram absorção e concentração de Cu em seus tecidos 40-60% menores que no tipo selvagem (PEÑARRUBIA et al., 2015; PUIG, 2014; SANCENÓN et al., 2004).

No entanto, na solução dos solos o Cu pode ser encontrado na sua forma oxidada (Cu^{2+}) (BRUNETTO et al., 2016). Desse modo, possivelmente ocorre a redução de Cu^{+2} para Cu^+ por redutases de membrana, favorecendo a absorção de Cu pelos COPTs (BERNAL et al., 2012; PEÑARRUBIA et al., 2015; PUIG, 2014; RYAN et al., 2013), esse mecanismo de absorção pode ser visualizado na Figura 1. Porém, é possível que o Cu também seja absorvido pelas células na sua forma oxidada (Cu^{2+}) pelos transportadores ZIP2 e ZIP4 em *Arabidopsis thaliana* (PEÑARRUBIA et al., 2015; WINTZ et al., 2003). Entretanto, há divergências entre autores nessa questão e necessita ser demonstrado experimentalmente em plantas (DEL POZO; CAMBIAZO; GONZÁLEZ, 2010; MILNER et al., 2013; PEÑARRUBIA et al., 2015; PRINTZ et al., 2016; WINTZ et al., 2003).

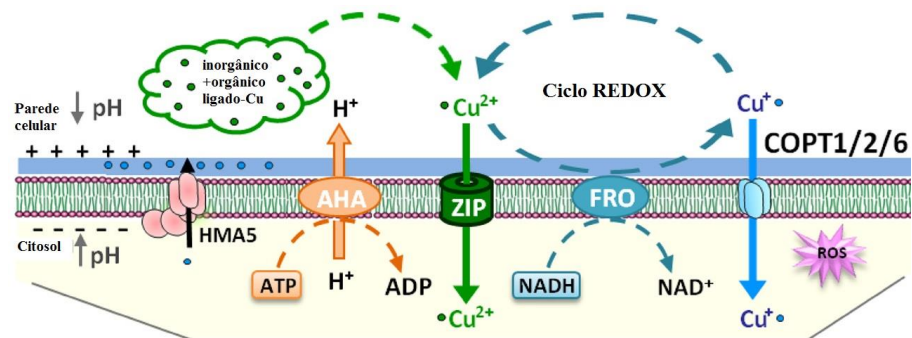
As redutases FRO4 (oxidase-redutase férrica 4) e FRO5 (oxidase-redutase férrica 5) de *A. thaliana* são altamente responsivas à deficiência de Cu, o que pode permitir a redução desse elemento nessas condições e, por consequência, sua entrada na célula (BERNAL et al., 2012; PEÑARRUBIA et al., 2015). Sabe-se que em *A. thaliana* a regulação da expressão de *FRO4* e *FRO5*, bem como a expressão de *COPT1* e *COPT2* ocorre através do fator de transcrição *SPL7* (BERNAL et al., 2012; PEÑARRUBIA et al., 2015; PRINTZ et al., 2016; PUIG, 2014; YAMASAKI et al., 2009).

Ainda, esse mecanismo de absorção conta com uma maior expressão de H^+ -ATPases (AHA) que são proteínas integrais de membrana plasmática, as quais acidificam o meio extracelular sob baixas concentrações de Cu, permitindo maior solubilização do micronutriente (PEÑARRUBIA et al., 2015; SANTI; SCHIMIDT, 2009). Sugere-se que essa estratégia de redução do Cu^{+2} para Cu^+ pode ter sido uma adaptação para favorecer a entrada de Cu por transportadores de alta afinidade e/ou para facilitar a entrada na forma que a planta mais utiliza no seu tráfego intracelular (PEÑARRUBIA et al., 2015), visto que a forma Cu^+ é a predominante em raízes e folhas (RYAN et al., 2013).

O Cu pode ser transportado nas formas Cu^+ e Cu^{2+} , mas há evidências que em arroz o Cu é transportado no xilema majoritariamente na forma complexada com ácido 2-desoximugineico, já no floema pode estar em diferentes complexos, dentre esses pode estar

associado a nicotianamina (Cu-NA) (ANDO et al., 2012; PRINTZ et al., 2016; RYAN et al., 2013).

Figura 1 – Modelo de absorção de Cu através da membrana plasmática em *Arabidopsis thaliana*.



Fonte: adaptado de Peñarrubia et al. (2015).

3 ARTIGO – ASPECTOS FISIOLÓGICOS, MORFOLÓGICOS E MOLECULARES DA HOMEOSTASE DE COBRE EM ARROZ (*Oryza sativa* L.) E A CONTRIBUIÇÃO DO TRANSPORTADOR OsHMA5

PHYSIOLOGICAL, MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR ASPECTS OF COPPER HOMEOSTASIS IN RICE (*Oryza sativa* L.) AND THE CONTRIBUTION OF THE OsHMA5 TRANSPORTER

RESUMO

O cobre (Cu) é um elemento mineral essencial para os vegetais, porém seu excesso ou deficiência podem causar diversos efeitos negativos ao metabolismo que, conseqüentemente, influenciam processos fisiológicos importantes, como a fotossíntese. Assim, através de diferentes estratégias as plantas precisam manter a homeostase de Cu nas células. O objetivo do presente trabalho foi caracterizar aspectos relacionados à homeostase de Cu em *Oryza sativa* através do papel do transportador OsHMA5, bem como de parâmetros fisiológicos e morfológicos do tipo selvagem (cv. Nipponbare) e do mutante *oshma5*. O trabalho foi conduzido em sala de crescimento controlada e as plantas foram submetidas a três concentrações de Cu (sem adição de Cu "0"; 0,2 e 20 µM) em solução nutritiva durante 13 dias. Em resposta a deficiência de Cu, plantas do tipo selvagem apresentaram maior expressão do transportador de Cu *OsCOPT1* e diminuição dos parâmetros fotossintéticos ETR e Y(II), antes de demonstrarem redução em parâmetros de crescimento. Houve menor concentração de elementos minerais (Cu, Fe, Mg e Zn) nos tecidos de parte aérea do mutante *oshma5* em 20 µM de Cu em relação ao tipo selvagem. No entanto, o tipo selvagem apresentou maior concentração desses elementos na parte aérea de plantas submetidas a 20 µM de Cu em relação às demais concentrações de Cu. Ainda, a maior concentração de Cu na solução nutritiva ocasionou efeitos negativos em parâmetros de crescimento (matéria seca de raízes e de parte aérea, área foliar, comprimento e área de superfície de raízes) no tipo selvagem e no mutante *oshma5*, evidenciando que o transportador OsHMA5 não contribui de modo significativo à tolerância ao excesso de Cu. No tipo selvagem, os miRNAs analisados (*miRNA397ab*, *miRNA398b* e *miRNA408*) são induzidos em deficiência de Cu, sendo assim parece que o mecanismo de economia de Cu é conservado em *Oryza sativa*.

Palavras-chave: Arroz. Fotoquímica. Metais pesados. MicroRNAs. Mutante.

ABSTRACT

Copper (Cu) is an essential mineral element for plants, but its excess or deficiency can cause several negative effects on metabolism, which consequently influence important physiological processes, such as photosynthesis. Therefore, the plants need to maintain Cu homeostasis through different strategies in the cells. The objective of the present work was to characterize aspects related to the Cu homeostasis in *Oryza sativa* through the role of the OsHMA5 transporter, as well as physiological and morphological parameters from both wild type (cv. Nipponbare) and *oshma5* mutant. The work was conducted in a controlled growth room and the plants were submitted to three concentrations of Cu (without addition of Cu "0"; 0.2 and 20 µM) in nutrient solution during 13 days. In response to Cu deficiency, wild type plants showed higher expression of the *OsCOPT1* Cu transporter and lower photosynthetic parameters ETR

and Y(II), before demonstrating reduction in growth parameters. There was lower concentration of mineral elements (Cu, Fe, Mg and Zn) in the shoot of the *oshma5* mutant in 20 μ M of Cu compared to the wild type. However, the wild type presented higher concentration of these elements in the shoot of plants submitted to 20 μ M of Cu in relation to the other concentrations of Cu. In addition, the higher concentration of Cu in the nutrient solution caused negative effects on growth parameters (dry matter of roots and shoot, leaf area, length and root surface area) in wild type and *oshma5* mutant, evidencing that the transporter OsHMA5 does not contribute significantly to Cu excess tolerance. In the wild type, the miRNAs analyzed (*miRNA397ab*, *miRNA398b* and *miRNA408*) were induced in Cu deficiency, so it seems that the Cu economy mechanism is conserved in *Oryza sativa*.

Keywords: Rice. Photochemistry. Heavy metals. MicroRNAs. Mutant.

INTRODUÇÃO

O cobre (Cu) é um micronutriente para o adequado crescimento e desenvolvimento vegetal em função de ser cofator de muitas proteínas que participam de diferentes processos fisiológicos, tais como fotossíntese, respiração, percepção hormonal, resposta ao estresse oxidativo e metabolismo da parede celular (BURKHEAD et al., 2009). O Cu caracteriza-se por ser um metal de transição, assim sua habilidade de variar entre dois estados de oxidação (Cu^+ e Cu^{2+}) possibilita sua participação em reações de transferência de elétrons (BERNAL et al., 2012).

Embora o Cu seja um elemento mineral essencial, seu excesso ou deficiência podem implicar em diversos efeitos prejudiciais ao metabolismo vegetal e afetar processos fisiológicos importantes, como a fotossíntese, ocorrendo redução de crescimento e de biomassa, alterações na síntese de pigmentos fotossintéticos, etc (ADREES et al., 2015; BURKHEAD et al., 2009; MARSCHNER, 2012; YRUELA, 2005; YRUELA, 2009). Além disso, principalmente em condição de excesso de Cu, pode ocorrer aumento na concentração de espécies reativas de oxigênio (EROs), as quais podem desencadear o estresse oxidativo, causando danos irreversíveis em proteínas, DNA, carboidratos e lipídeos (GILL; TUTEJA, 2010). Para reduzir os danos causados pelas EROs, os organismos aeróbicos apresentam um sistema antioxidante incluindo diversas enzimas e compostos não enzimáticos que tem como objetivo reduzir a concentração de EROs nas células (SHARMA et al., 2012). Dentre os antioxidantes enzimáticos, estão as metaloenzimas superóxidos dismutases (SODs), como a FeSOD e a CuZnSOD, as quais catalisam a dismutação do ânion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) em O_2 e H_2O_2 (GILL; TUTEJA, 2010).

Para manter a homeostase de Cu nas células vegetais, vários processos necessitam ser regulados, tais como a absorção de Cu pelas raízes, transporte das raízes à parte aérea, detoxificação no vacúolo e o transporte entre os tecidos de diferentes órgãos (HUANG et al., 2016). Um mecanismo já descrito para *Arabidopsis thaliana* é o de economia de Cu em condições de deficiência de Cu (BURKHEAD et al., 2009). Esse mecanismo é regulado pelo fator de transcrição SPL7 (*SQUAMOSA promoter binding like protein 7*), o qual regula diferentes proteínas cúpricas indiretamente através de microRNAs específicos e diretamente proteínas envolvidas na homeostase de Cu por meio da ligação em sequências específicas na região do promotor de seus alvos (YAMASAKI et al., 2009). Esse mecanismo permite que o Cu seja direcionado com prioridade a proteínas que participam de processos fundamentais no metabolismo vegetal, como a plastocianina e citocromo *c* oxidase, e reduz o uso de Cu por proteínas consideradas menos essenciais ao metabolismo vegetal, como as CuZnSODs (BURKHEAD et al., 2009; PEÑARRUBIA et al., 2010). Parece que esse mecanismo de adaptação à deficiência de Cu é conservado em arroz (*Oryza sativa* L.), devido seu genoma codificar microRNAs homólogos aos que participam desse mecanismo em *A. thaliana* (YAMASAKI; PILON; SHIKANAI, 2008), como o OsmiRNA397 (ZHANG et al., 2013) e OsmiRNA408 (ZHANG et al., 2017).

O arroz além de ser uma importante cultura agrícola no mundo, apresenta uma base de dados moleculares bem estabelecida, assim é uma planta modelo para estudos em monocotiledôneas (SONG et al., 2013). Já foram descritos diferentes transportadores e proteínas que atuam na homeostase de Cu em diferentes espécies vegetais, abordados recentemente pelas revisões de Printz et al. (2016), Migocka (2015) e Puig (2014). Os transportadores da família CTR-like/COPT de plantas estão relacionados, principalmente, à absorção de Cu^+ (PUIG, 2014). Em arroz (*Oryza sativa*) há sete membros dessa família (OsCOPT1-7) (YUAN et al., 2011). Parece que *OsCOPT1*, *OsCOPT5* e *OsCOPT7* são regulados de forma semelhante em resposta a concentração externa de Cu (YUAN et al., 2011). Já as Cu-ATPases, as quais fazem parte da subfamília $\text{P}_{1\text{B}}$ -ATPases (AXELSEN; PALMGREN, 1998; MIGOCKA, 2015), são proteínas que contribuem, em geral, no transporte intracelular entre organelas e o citosol, detoxificação de Cu, bem como no efluxo de Cu para o meio extracelular (MIGOCKA, 2015). No genoma de arroz existem nove genes que codificam para proteínas das $\text{P}_{1\text{B}}$ -ATPases (*OsHMA1-9*) (MIGOCKA, 2015; WILLIAM; MILLS, 2005). Dentre esses, o transportador OsHMA5, localizado principalmente nas células do periciclo das

raízes, parece estar envolvido no efluxo de Cu para o xilema nos estágios vegetativos e reprodutivos (DENG et al., 2013).

Obter mais informações sobre o transporte de Cu e sua homeostase em plantas pode ajudar no desenvolvimento de plantas modificadas visando a maior tolerância a solos contaminados por Cu para uso na fitorremediação ou para maior produção na cultura (HUANG et al., 2016; YRUELA, 2009). Além disso, a alteração da concentração de Cu em órgãos vegetais de consumo vai implicar em aumento ou redução da entrada de Cu na cadeia alimentar (HUANG et al., 2016; YRUELA, 2009).

Apesar de um crescente interesse nos últimos anos sobre a homeostase de Cu em plantas, muitos transportadores de Cu precisam ser identificados e caracterizados. Ainda, é necessário entender como influenciam em processos fisiológicos importantes, como a fotossíntese, e os mecanismos relacionados a tolerância e a deficiência de Cu em diferentes espécies vegetais. Desse modo, este trabalho objetiva compreender melhor aspectos relacionados com a homeostase de Cu, bem como sobre o papel do transportador OsHMA5 em *Oryza sativa*, através de parâmetros fisiológicos, morfológicos e moleculares com o uso do tipo selvagem (cv. Nipponbare) e do mutante *oshma5*.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal e condições de crescimento

Foram realizados dois experimentos diferentes, porém sob as mesmas condições experimentais, os quais foram conduzidos em sala de crescimento controlada. Foram utilizadas sementes de *Oryza sativa* do mutante *oshma5* (NF8524) e de seu respectivo tipo selvagem, cultivar Nipponbare (cv. Nipponbare). O mutante possui a inserção do retrotransposon *Tos17* no segundo éxon do OsHMA5, conforme descrito por Deng et al. (2013).

As sementes foram submetidas a um protocolo de desinfestação e em seguida mantidas em um recipiente com água destilada, sob temperatura constante de 25°C durante 24 horas no escuro. Subsequentemente, as sementes foram transferidas para placas de petri, onde permaneceram por sete dias sob temperatura de 25°C e com fotoperíodo de 16h/8h de luz/escuro. Em seguida, as plantas foram transferidas para copos plásticos de 50 ml contendo vermiculita e mantidas com água destilada durante quatro dias, posteriormente as plantas foram cultivadas nas mesmas condições, porém em solução modificada de Ishimaru et al. (2005),

contendo 0,7 mM K₂SO₄, 0,1 mM KCl, 0,14 mM KH₂PO₄, 1,39 mM Ca(NO₃)₂ .4H₂O, 0,244 mM MgSO₄.7 H₂O, 10 µM H₃BO₃, 0,5 µM MnSO₄. H₂O, 0,2 µM CuSO₄.5 H₂O, 0,275 µM ZnSO₄.7 H₂O, 0,05 µM Na₂MoO₄. 2H₂O, e 0,1 mM Fe⁺³-EDTA.

Após nove dias, as plantas, em estágio V1-V2 (COUNCE; KEISLING; MITCHELL, 2000), foram transferidas para as unidades experimentais (UEs), sendo uma UE um recipiente de 400 ml contendo seis plantas. Nessa condição, as plantas permaneceram em solução controle (descrita anteriormente) por quatro dias para aclimatação. Posteriormente, as plantas foram submetidas aos tratamentos de concentração de Cu (sem adição de Cu “0”; 0,2 e 20 µM, fornecidos na forma de CuSO₄.5 H₂O) durante 13 dias. No final do experimento as plantas estavam em V3-V4 (COUNCE; KEISLING; MITCHELL, 2000). A cada três dias foram realizadas as trocas da solução nutritiva e o pH foi ajustado para 5,5 com adição de HCl ou NaOH.

Produção de matéria seca e comprimento de colmo

No final do experimento (aos 13 dias do início dos tratamentos), a parte aérea e raízes de três plantas por tratamento foram coletadas e secas em estufa de ventilação forçada a 65°C até atingir massa constante. A matéria seca foi obtida com o uso de uma balança de precisão. O comprimento de colmo foi determinado com o uso de uma régua graduada, medindo-se da base do colmo até o ápice do colmo de três plantas por tratamento.

Avaliações biométricas de raízes e área foliar

A coleta das plantas foi realizada aos 13 dias do início dos tratamentos, para as avaliações biométricas de raízes utilizaram-se raízes de cinco plantas por tratamento. Foram avaliados os parâmetros diâmetro médio de raízes (mm planta⁻¹), comprimento de raízes (cm planta⁻¹), volume de raízes (cm³ planta⁻¹) e área de superfície de raízes (cm² planta⁻¹). Para a área foliar foi utilizado três plantas por tratamento. Imagens digitalizadas de raízes e folhas foram geradas com o auxílio do scanner EPSON 11000 com resolução de 600 dpi e 200 dpi, respectivamente. As amostras foram suspensas em uma lâmina de água de 0,5 cm presente em uma bandeja de acrílico transparente de 30-40 cm². O software WinRHIZO© Pro 2007 foi utilizado para analisar as imagens digitalizadas.

Concentração de elementos minerais nos tecidos

Aos 13 dias do início dos tratamentos, as plantas foram coletadas e separadas em raízes e folhas, foram utilizadas cinco plantas por tratamento. As raízes foram lavadas com água Milli-Q e posteriormente as amostras foram submetidas à estufa de ar forçado a 65°C durante 24 horas. As análises foram realizadas no Laboratório de Química da UFSM. As amostras secas de tecidos de raízes e folhas foram decompostas em um tubo de polipropileno de 15 ml contendo 1 ml de ácido nítrico P.A., previamente destilado em sistema de destilação de quartzo (duoPUR, Subboiling Distillation System, Milestone, Itália), sob a temperatura de 90°C, durante 30 min, em banho-maria, utilizando massas entre 2 e 7 mg de amostra seca. Após a decomposição, as amostras foram aferidas ao volume final de 5 ml. Os elementos Ca, Fe, K, Mg, Mn, P e Zn foram quantificados utilizando um espectrômetro de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES) (modelo Optima 4300 DV, Perkin Elmer Sciex, Canadá). Para a determinação de Cu, foi utilizado um espectrômetro de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) (modelo Elan DRC II, Perkin Elmer Sciex, Canadá).

Atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD)

Para determinação da atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), aos 13 dias do início dos tratamentos, plantas foram coletadas e separadas em folhas e raízes, as quais foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em ultrafreezer -80°C, cada repetição foi composta por 22 plantas, totalizando três repetições. Antes das análises, as amostras foram maceradas em nitrogênio líquido e pesadas 0,5 g de folhas e raízes. As amostras foram homogeneizadas utilizando 3 ml de solução tampão de fosfato de sódio 0,05 M (pH 7,8), contendo 1 mM EDTA e 0,5 % Triton X-100. O homogeneizado foi centrifugado a 13000 g durante 20 min a 4°C. O sobrenadante foi utilizado para ensaio de atividade enzimática e conteúdo proteico (ZHU et al., 2004; BRADFORD, 1976).

A atividade das SOD foi avaliada de acordo com o método espectrofotométrico descrito por Giannopolitis e Ries (1977). Para a reação, adicionaram-se em tubos de ensaio 3 ml do mix contendo solução tampão de fosfato de potássio 50 mM (pH 7,8), metionina 13mM, EDTA 0,1 µM, NBT 75 µM e riboflavina (2 µM). Posteriormente, os tubos foram incubados em lâmpada fluorescente de 15 W durante 15 minutos sendo então realizada a leitura da absorbância a 560 nm. Por este método, foi determinada a inibição da redução do NBT (*p-nitro blue tetrazolium*) pelo extrato enzimático evitando assim a formação do cromóforo. Para efeito de cálculo, o

branco da reação foi considerado como sendo os tubos que não continham extrato, exposto e não exposto à luz. Uma unidade de atividade enzimática (U) de SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para obter 50% de inibição da redução do NBT pela SOD contida no extrato enzimático. A atividade foi determinada pelo cálculo da quantidade de extrato que inibe 50% da reação de NBT e expressa em $U\ mg^{-1}$ proteína.

Determinação da concentração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2)

Aos 13 dias do início dos tratamentos, plantas foram coletadas e separadas em folhas e raízes, as quais foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em ultrafreezer $-80^{\circ}C$, cada repetição foi composta por 22 plantas, totalizando três repetições. Antes das análises as amostras foram maceradas em nitrogênio líquido. A concentração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) foi determinada conforme Loreto e Velikova (2001). Amostras de tecidos de raízes e parte aérea (aproximadamente 0,1 g) foram misturadas em 2,0 ml de ácido tricloroacético (TCA) 0,1% (p/v). Em seguida, o homogeneizado foi centrifugado a $12000 \times g$ por 15 minutos a $4^{\circ}C$ e 0,5 ml do sobrenadante foi adicionado em 0,5 ml de tampão fosfato de potássio (10 mM) (pH 7,0) e 1 ml de KI (1M). A leitura foi realizada na absorvância de 390 nm. A concentração de H_2O_2 foi expressa em $\mu mol\ g^{-1}$ MF (matéria fresca).

Concentração de pigmentos fotossintéticos

Aos 13 dias do início dos tratamentos, foram coletadas folhas e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido, posteriormente foram armazenadas em ultrafreezer $-80^{\circ}C$. Cada repetição foi composta por 22 plantas, totalizando três repetições. A determinação foi de acordo com o método de Hiscox e Israelstam (1979) e calculada com o auxílio da fórmula de Lichtenthaler (1987). Amostras de 0,05 g de folhas maceradas em nitrogênio líquido foram incubadas a $65^{\circ}C$ em dimetilsulfóxido (DMSO) até os pigmentos serem completamente removidos. Para a determinação da clorofila *a*, clorofila *b* e carotenoides, a absorvância da solução foi medida em 663 e 645 nm e 470 nm, respectivamente, utilizando um espectrofotômetro. A clorofila total foi obtida através da soma da clorofila *a* e clorofila *b*.

Fluorescência da clorofila *a*

Para as medições dos parâmetros da fluorescência da clorofila *a* foi utilizado o fluorômetro de pulso modulado JUNIOR-PAM (Walz, Alemanha) em plantas aos 7 e 13 dias após a adição dos tratamentos. As medidas foram realizadas na última folha completamente expandida de quatro plantas por tratamento (7 dias) e cinco plantas por tratamento (13 dias). As plantas estavam adaptadas ao escuro e as medições iniciaram às 5:00 horas da manhã. A fluorescência mínima (F_o) foi medida com pulso modulado $<0.05 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ por 1,8 μs . A fluorescência máxima (F_m) foi determinada após a folha ser submetida a um pulso de luz actínica de $10.000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ por 0,6 s. O rendimento quântico máximo do PSII foi obtido pela relação F_v/F_m , na qual $F_v/F_m = (F_m - F_o)/F_m$ (GENTY; BRIANTAIS; BAKER, 1989; MAXWELL; JOHNSON, 2000). O rendimento quântico fotoquímico efetivo do PSII ($Y(II)$) e a taxa de transporte de elétrons (ETR) foram obtidos submetendo cada folha a nove níveis de radiação fotossinteticamente ativa (PAR): 0, 125, 190, 285, 420, 625, 820, 1150 e 1500 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ por 10s (FERREIRA et al., 2015). Para a obtenção dos gráficos, as medidas da ETR foram ajustadas conforme a equação $ETR = ETR_{\text{max}} [1 - e^{-kQ}]$, onde k é uma constante de ajuste e Q é a intensidade da luz (PAR) (FERREIRA et al., 2015; RASCHER; LIEBIG; L\u00dcTTGE, 2000).

An\u00e1lises de express\u00e3o g\u00eanica por RT-qPCR

Aos 13 dias do in\u00edcio dos tratamentos foram coletadas folhas do tipo selvagem (cv. Nipponbare) de plantas submetidas aos tratamentos sem adi\u00e7\u00e3o de Cu "0" e 0,2 μM de Cu. O RNA total foi extra\u00eddo com o uso do reagente TRIzol\u2122 seguindo as instru\u00e7\u00f5es do fabricante. O RNA foi quantificado pelo espectrofot\u00f4metro NANODROP. A transcri\u00e7\u00e3o reversa, na qual o RNA foi convertido em cDNA, foi realizada utilizando a enzima M-MLV (Invitrogen - Life Technologies Corporation) transcriptase reversa de acordo com as instru\u00e7\u00f5es do fabricante, foi adicionado \u00e0 rea\u00e7\u00e3o 1 μl de stem-loop, em seguida o cDNA foi armazenado \u00e0 -20°C . Os primers utilizados est\u00e3o descritos no Quadro 1 (Material suplementar). Para a rea\u00e7\u00e3o em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qPCR) foi utilizado um volume de 20 μl [sendo 10 μl de cDNA dilu\u00eddo 100 vezes e 10 μl da solu\u00e7\u00e3o contendo: 49,7 H_2O Milli-Q, 26,5 μl de tamp\u00e3o de PCR 10X, 15,9 μl de MgCl_2 50 mM, 5,3 μl de primers, 2,7 μl dNTPs, 26,5 μl de SYBR Green\u2122 e 0,7 μl de Platinum Taq DNA polimerase (5 U/ μl , Invitrogen\u2122, Carlsbad, CA, EUA)].

A reação foi realizada em um aparelho StepOne Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), com um passo inicial de desnaturação de 5 minutos em 95°C e seguida por 40 ciclos de 95°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos; por fim as amostras foram submetidas a uma temperatura de 95°C a 15 segundos, após mantidas por 1 minuto em 60°C e a 95°C por 15 segundos. Os dados obtidos foram quantificados de acordo com o método do Ct comparativo ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001) e a eficiência da PCR foi analisada conforme descrito por Ricachenevsky et al. (2011). Os valores de Ct para todos os genes foram normalizados para o valor Ct da *UBQ5* (JAIN et al., 2006). O tipo selvagem (cv. Nipponbare) em condição de 0,2 μ M de Cu foi utilizado como controle e foram utilizadas quatro repetições biológicas para cada tratamento, cada repetição contendo tecidos de três plantas.

Análise estatística

Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA). As médias dos tratamentos foram comparadas pelo Teste t e Teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro, com o auxílio do programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2000).

RESULTADOS

Parâmetros de crescimento e concentração de elementos minerais em plantas do tipo selvagem e do mutante *oshma5*

Desde a germinação observou-se diferenças fenotípicas, como na coloração de folhas e no crescimento, entre o tipo selvagem e o mutante *oshma5* (Figura 4e; Material suplementar: Figura 10), isso difere do que foi observado no trabalho de Deng et al. (2013). Esses autores não observaram diferenças quanto ao crescimento entre o tipo selvagem e mutantes *oshma5* durante o período vegetativo em solução controle (contendo 0,2 μ M de Cu).

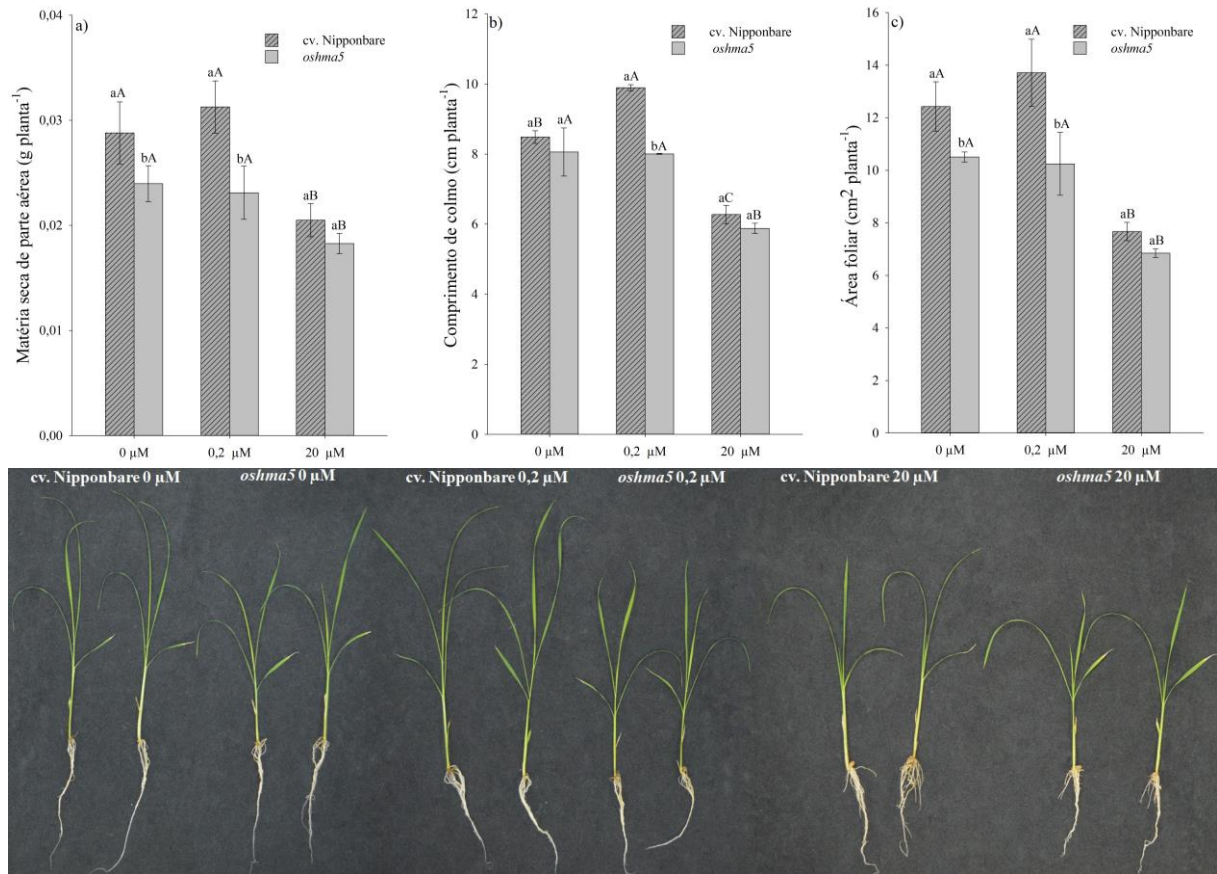
Nos parâmetros de crescimento, como matéria seca de raízes e de parte aérea, área foliar, comprimento e área de superfície de raízes (Figura 1; Figura 2), plantas do tipo selvagem e do mutante *oshma5* em deficiência de Cu não diferiram de plantas cultivadas em concentração controle aos 13 dias de tratamento. No entanto, o mutante *oshma5* apresentou menor matéria seca de parte aérea e área foliar em relação ao tipo selvagem nas concentrações 0 e 0,2 μ M de Cu, sendo aproximadamente 15% e 25% menor em ambos parâmetros, respectivamente (Figura

1a; Figura 1c). Na presença de 0,2 μM de Cu, o mutante *oshma5* apresentou menor comprimento de colmo, matéria seca de raízes, comprimento e área de superfície de raízes do que o tipo selvagem (Figura 1; Figura 2). Por outro lado, nessa mesma condição de Cu, o mutante *oshma5* apresentou maior diâmetro de raízes em relação ao tipo selvagem (Figura 2c).

Já na concentração de 20 μM de Cu, tanto em plantas do tipo selvagem e do mutante *oshma5* houve diminuição em parâmetros de crescimento em relação às demais concentrações de Cu, evidenciado pelos menores valores na matéria seca de raízes e de parte aérea, comprimento de colmo, área foliar, comprimento e área de superfície de raízes (Figura 1; Figura 2). Na concentração de 20 μM de Cu, o tipo selvagem apresentou o maior diâmetro médio de raízes, quando comparado aos demais tratamentos de Cu (Figura 2c). Em relação ao volume de raízes, o mutante *oshma5* apresentou valores menores do que o tipo selvagem na concentração de 20 μM de Cu (Figura 2e).

Ao se comparar a matéria seca total (matéria seca de raízes + matéria seca de parte aérea) em plantas do tipo selvagem e do mutante *oshma5* na condição controle em relação a de 20 μM de Cu (Figura 1; Figura 2), observou-se que o mutante *oshma5* apresentou uma diferença entre esses dois tratamentos de 16%, enquanto que no tipo selvagem foi de 31%. Em relação a área foliar, no mutante *oshma5* houve uma diferença entre plantas da condição controle e plantas em 20 μM de Cu de 33%, já no tipo selvagem a diferença foi de 44%. E ainda, ao comparar dados de comprimento de colmo e de raízes, observou-se que as raízes foram mais prejudicadas na maior concentração de Cu em relação ao controle (0,2 μM de Cu) no tipo selvagem e no mutante *oshma5*.

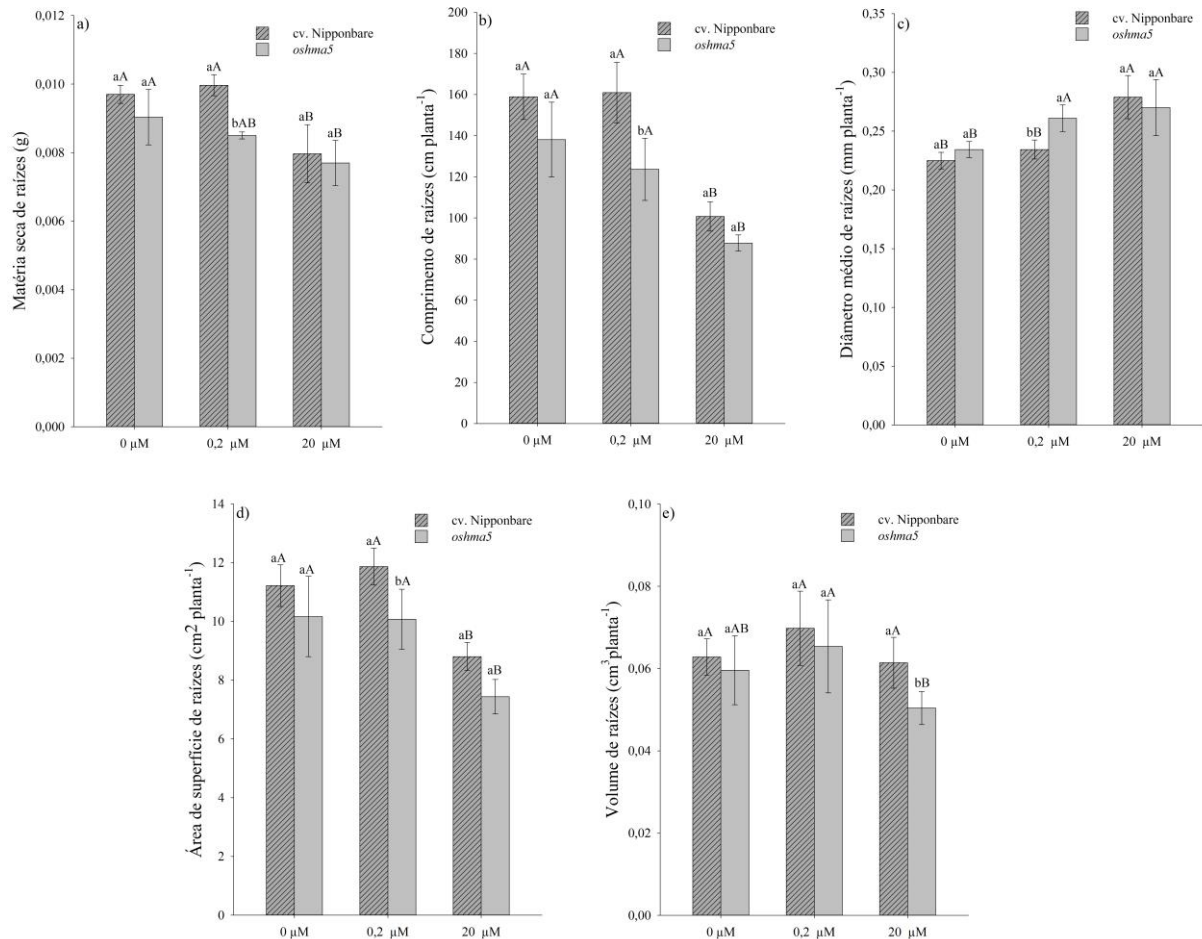
Figura 1 – Matéria seca de parte aérea (a), comprimento de colmo (b), área foliar (c) e comparação de plantas do tipo selvagem (cv. Nipponbare) e do mutante *oshma5* nas diferentes concentrações de Cu na solução nutritiva aos 13 dias de tratamento.



Fonte: DEL FRARI, B. K. (2017).

Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre o tipo selvagem e o mutante *oshma5* na mesma concentração de Cu pelo Teste t ($P < 0,05$). Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa no tipo selvagem e no mutante *oshma5* em diferentes concentrações de Cu pelo Teste de Tukey ($P < 0,05$). As barras de erro representam \pm desvio padrão ($n=3$).

Figura 2 – Matéria seca de raízes (a), comprimento de raízes (b), diâmetro médio de raízes (c), área de superfície de raízes (d) e volume de raízes (e) de plantas do tipo selvagem (cv. Nipponbare) e do mutante *oshma5* nas diferentes concentrações de Cu na solução nutritiva aos 13 dias de tratamento.



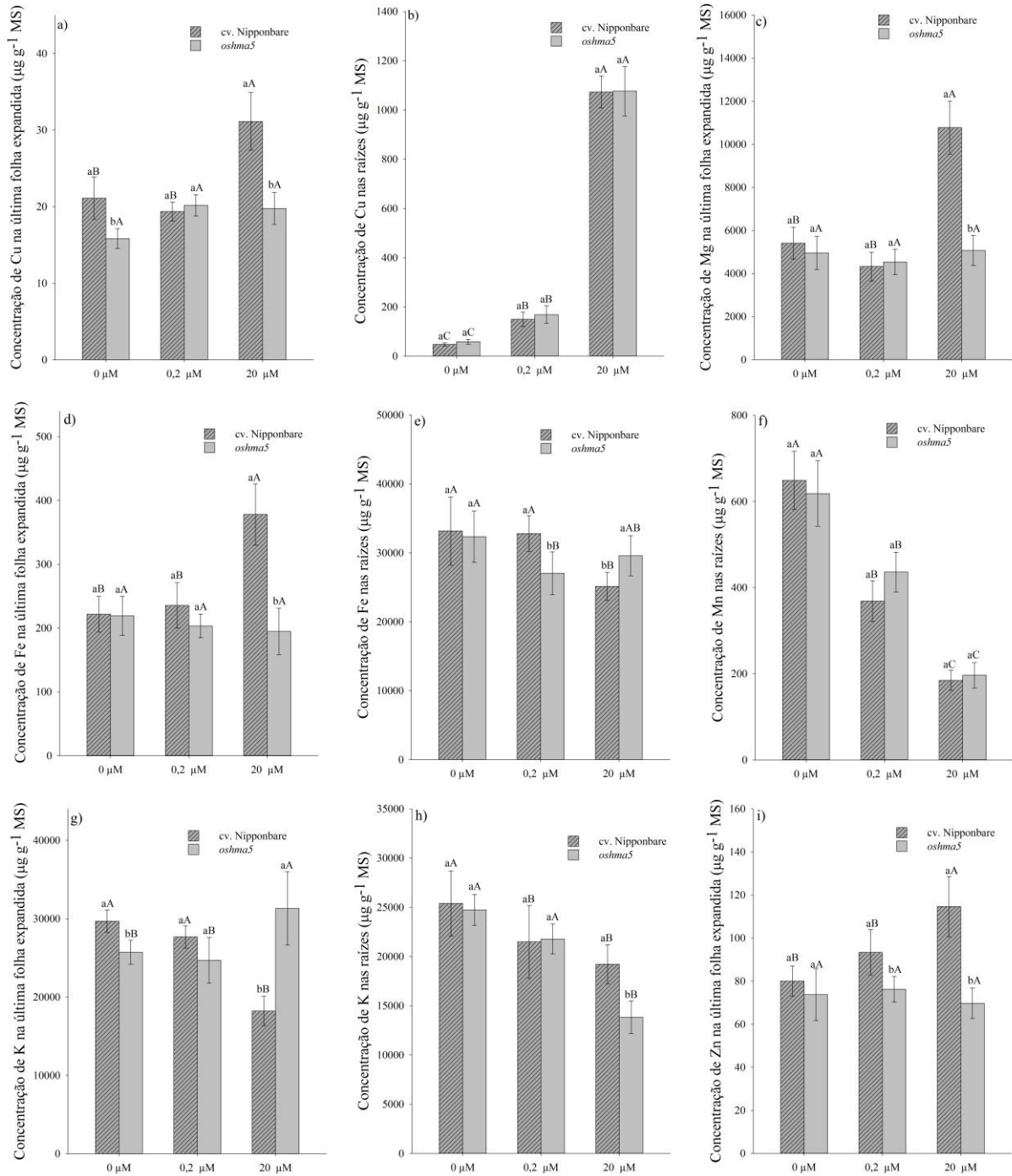
Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre o tipo selvagem e o mutante *oshma5* na mesma concentração de Cu pelo Teste t ($P < 0,05$). Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa no tipo selvagem e mutante *oshma5* em diferentes concentrações de Cu pelo Teste de Tukey ($P < 0,05$). As barras de erro representam \pm desvio padrão ($n=5$; exceto $n=3$ para matéria seca de raízes).

Após 13 dias de tratamento, tanto as plantas do tipo selvagem como do mutante *oshma5* apresentaram maior concentração de Cu em tecidos de raízes quando submetidas ao excesso de Cu em comparação às demais concentrações de Cu (Figura 3b). Plantas do tipo selvagem apresentaram maior concentração de Cu em tecidos da parte aérea quando cultivadas em condição de excesso de Cu em comparação ao controle e deficiência de Cu, sendo 32% maior que aos demais tratamentos (Figura 3a). Já o mutante *oshma5* não apresentou diferença na concentração de Cu em tecidos de parte aérea com a variação desse elemento na solução nutritiva (Figura 3a). Quando são comparadas as concentrações de Cu entre o tipo selvagem e

o mutante *oshma5* no mesmo tratamento, pode-se observar que o mutante *oshma5* apresentou concentrações de Cu menores em tecidos da parte aérea sob deficiência e excesso de Cu (Figura 3a), o que era esperado de acordo com estudos anteriores sobre o OsHMA5 (DENG et al., 2013).

Plantas do tipo selvagem e do mutante *oshma5* apresentaram menor concentração de Mn nos tecidos radiculares com o aumento da concentração de Cu na solução nutritiva (Figura 3f), o mesmo comportamento não foi observado nos tecidos de parte aérea (Material suplementar: Tabela 1). Nos tecidos de parte aérea o mutante *oshma5* apresentou concentrações de Mg, Fe e Zn menores do que o tipo selvagem na condição de excesso de Cu, sendo uma diferença de 53%, 48% e 39%, respectivamente (Figura 3c; Figura 3d; Figura 3i). Porém, ao se comparar a concentração desses elementos nos tecidos de parte aérea no mesmo genótipo em relação às concentrações de Cu na solução nutritiva, observou-se que apenas o tipo selvagem apresentou variação na concentração desses elementos, sendo os maiores valores encontrados em 20 μ M de Cu. Ainda, em 20 μ M de Cu, observou-se no tipo selvagem a menor concentração de Fe nos tecidos de raízes em relação aos demais tratamentos de Cu (Figura 3e). Em relação ao K, observou-se menor concentração nos tecidos de raízes do mutante *oshma5* em relação ao tipo selvagem na concentração de 20 μ M de Cu (Figura 3h). Porém nos tecidos de parte aérea, em 20 μ M de Cu, o mutante *oshma5* apresentou concentração de K 42% maior do que o tipo selvagem (Figura 3g). Nessa concentração de Cu, o tipo selvagem apresentou a menor concentração de K nos seus tecidos de parte aérea, já no mutante *oshma5* ocorreu a maior concentração de K nos seus tecidos de parte aérea (Figura 3g).

Figura 3 – Concentração de Cu (a), Mg (c), Fe (d), K (g) e Zn (i) na última folha completamente expandida e de Cu (b), Fe (e), Mn (f) e K (h) em tecidos de raízes no tipo selvagem (cv. Nipponbare) e no mutante *oshma5* aos 13 dias de tratamento.

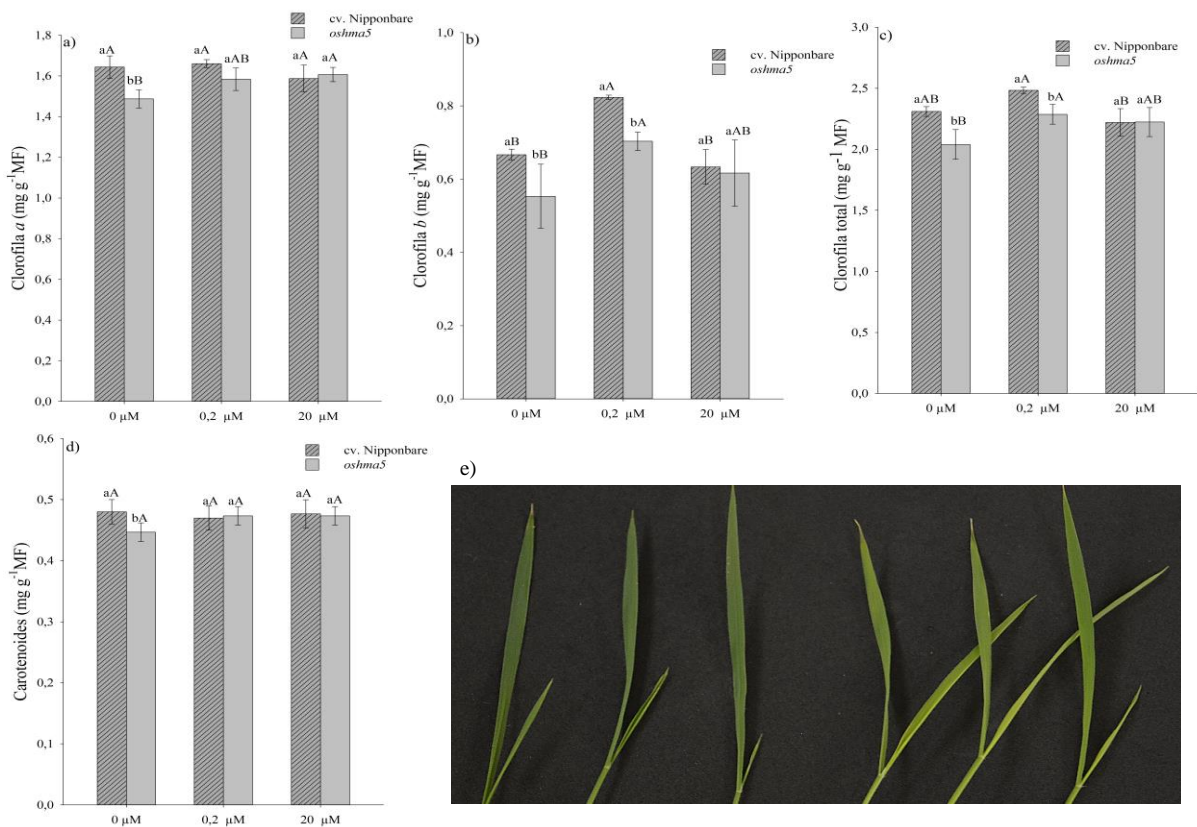


Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre o tipo selvagem e o mutante *oshma5* na mesma concentração de Cu pelo Teste t ($P < 0,05$). Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa no tipo selvagem e mutante *oshma5* em diferentes concentrações de Cu pelo Teste de Tukey ($P < 0,05$). As barras de erro representam \pm desvio padrão ($n=5$).

Pigmentos fotossintéticos

Em relação aos pigmentos fotossintéticos, apenas na deficiência de Cu o mutante *oshma5* apresentou menor concentração de clorofila *a* e de carotenoides do que o tipo selvagem (Figura 4a; Figura 4d). Além disso, o mutante *oshma5* apresentou menor concentração de clorofila *b* e de clorofila total (*a+b*) em comparação ao tipo selvagem nas concentrações de 0 e 0,2 μM de Cu (Figura 4b; Figura 4c). Um aspecto importante é que antes de iniciar os tratamentos, aos 15 dias após a emergência, quando as plantas estavam em solução nutritiva contendo 0,2 μM de Cu, pode-se observar acentuada diferença na coloração de folhas entre o tipo selvagem e o mutante *oshma5* (Figura 4e).

Figura 4 – Concentração de clorofila *a* (a), clorofila *b* (b), clorofila total (c) e carotenoides (d) em folhas de plantas do tipo selvagem (cv. Nipponbare) e do mutante *oshma5* aos 13 dias de tratamento. Diferença visual de coloração entre plantas do tipo selvagem (à esquerda) e mutante *oshma5* (à direita) em solução controle (0,2 μM de Cu) (e).



Fonte: (DEL FRARI, B. K. 2017).

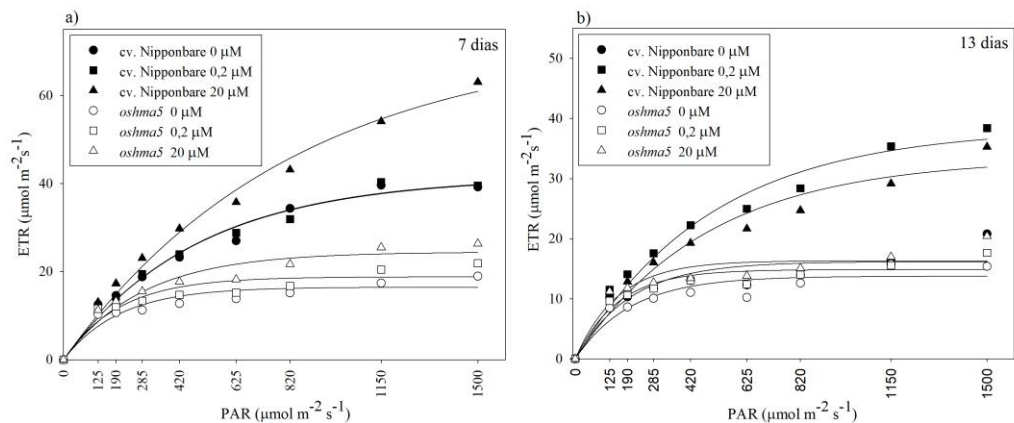
Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre o tipo selvagem e o mutante *oshma5* na mesma concentração de Cu pelo Teste t (P < 0,05). Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa no tipo selvagem e mutante *oshma5* em diferentes concentrações de Cu pelo Teste de Tukey (P < 0,05). As barras de erro representam \pm desvio padrão (n=3; 22 plantas cada repetição).

Fluorescência da clorofila *a*

Aos 13 dias de tratamento, o mutante *oshma5* apresentou valores um pouco menores de Fv/Fm em comparação ao tipo selvagem na condição de deficiência de Cu (Material suplementar: Figura 11e), e ainda, o excesso de Cu não alterou essa relação em plantas do tipo selvagem e do mutante *oshma5* (Material suplementar: Figura 11e). Além disso, aos 7 dias de tratamento, não houve diferença entre o tipo selvagem e o mutante *oshma5* nesse parâmetro (dados não apresentados).

Aos 7 dias de tratamento, a ETR aumentou gradualmente com o aumento da radiação fotossinteticamente ativa (PAR) em folhas do tipo selvagem em todas as concentrações de Cu, mas com maior intensidade na presença de 20 μM de Cu (Figura 5a). Por outro lado, o aumento na concentração externa de Cu não alterou a ETR no mutante *oshma5*, e ainda, a partir da PAR de 285 μmol fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, em todas as concentrações de Cu, observou-se diferenças significativas entre o tipo selvagem e o mutante *oshma5* (Figura 5a). Já aos 13 dias de tratamento, a deficiência de Cu afetou a ETR no tipo selvagem de forma drástica, sendo que seu comportamento não diferiu do mutante *oshma5* (Figura 5b). Nas condições de 0,2 e 20 μM de Cu, o tipo selvagem mostrou um incremento na ETR conforme o aumento da PAR (Figura 5b), assim como observado aos 7 dias. Ainda, o mutante *oshma5* apresentou menores valores de ETR em comparação ao tipo selvagem a partir da PAR de 125 μmol fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e 285 μmol fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ em 0,2 e 20 μM de Cu, respectivamente (Figura 5b).

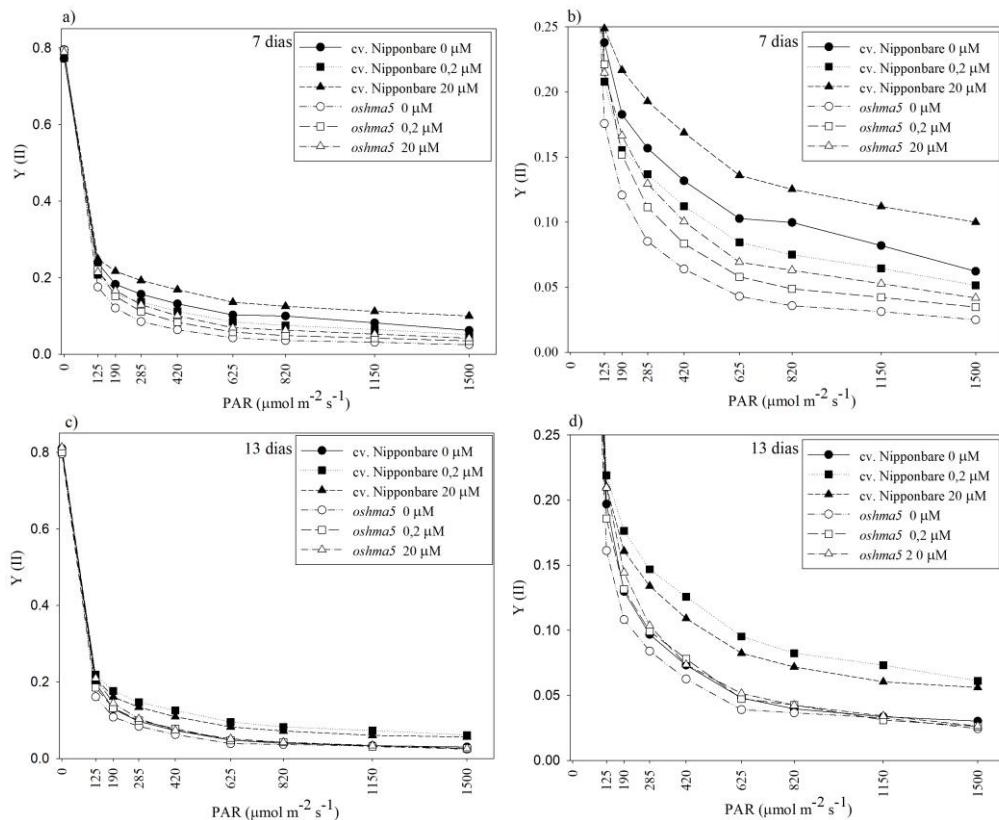
Figura 5 – Taxa de transporte de elétrons (ETR) relativa a radiação fotossinteticamente ativa (PAR) em folhas do tipo selvagem (cv. Nipponbare) e do mutante *oshma5* aos 7 (a) e 13 (b) dias de tratamento.



Em relação ao Y(II), aos 7 dias de tratamento de Cu, na concentração de 20 μM de Cu o tipo selvagem apresentou a partir de 285 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ os maiores valores em compara\u00e7\u00e3o \u00e0s demais concentra\u00e7\u00f5es de Cu (Figura 6a; Figura 6b). Ainda, aos 7 dias, o mutante *oshma5* apresentou os menores valores de Y(II) a partir da PAR de 125, 625 e 190 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ em rela\u00e7\u00e3o ao tipo selvagem nas concentra\u00e7\u00f5es 0, 0,2 e 20 μM de Cu, respectivamente (Figura 6a; Figura 6b).

Na avalia\u00e7\u00e3o aos 13 dias de tratamento de Cu, na condi\u00e7\u00e3o de defici\u00eancia de Cu o tipo selvagem apresentou o mesmo comportamento no par\u00e2metro Y(II) que o mutante *oshma5* a partir da PAR de 190 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, corroborando com o comportamento apresentado no par\u00e2metro ETR aos 13 dias em defici\u00eancia de Cu (Figura 5b; Figura 6d; Figura 6e). Ainda, aos 13 dias de tratamento, o tipo selvagem apresentou os maiores valores de Y(II) em 0,2 e 20 μM de Cu (Figura 6d; Figura 6e).

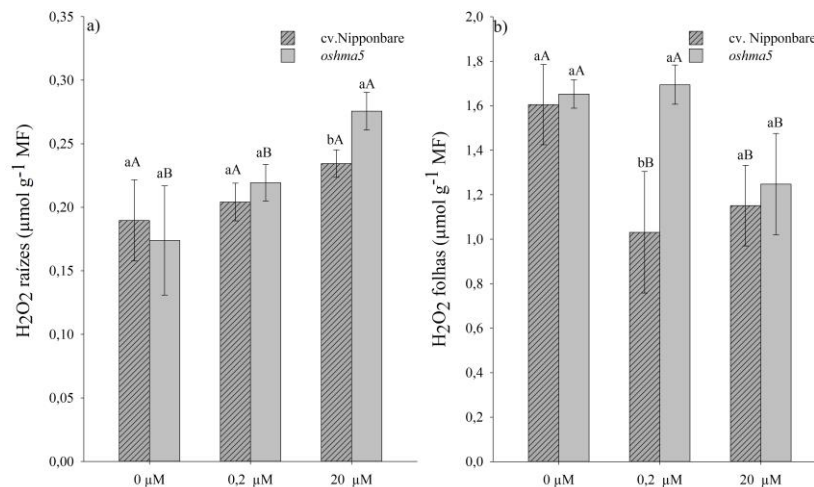
Figura 6 – Rendimento qu\u00e2ntico efetivo do fotossistema II (Y(II)) em folhas do tipo selvagem (cv. Nipponbare) e mutante *oshma5* aos 7(a;b) e 13(c;d) dias de tratamento (7 dias, n=4; 13 dias, n=5).



Concentração de H₂O₂

O mutante *oshma5* apresentou maior concentração de H₂O₂ nos tecidos de raízes na presença de 20 μ M de Cu em relação às demais concentrações de Cu, bem como ao comparar com o tipo selvagem (Figura 7a). Já nos tecidos foliares, a concentração de H₂O₂ foi maior no mutante *oshma5* em relação ao tipo selvagem apenas na concentração de 0,2 μ M de Cu (Figura 7b). A menor concentração de H₂O₂ nos tecidos foliares no mutante *oshma5* ocorreu em 20 μ M de Cu em comparação às demais concentrações de Cu. Já no tipo selvagem houve maior concentração de H₂O₂ nos tecidos foliares em deficiência de Cu em relação às demais concentrações de Cu (Figura 7b).

Figura 7 – Concentração de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em raízes (a) e em folhas (b) no tipo selvagem (cv. Nipponbare) e no mutante *oshma5* aos 13 dias de tratamento.



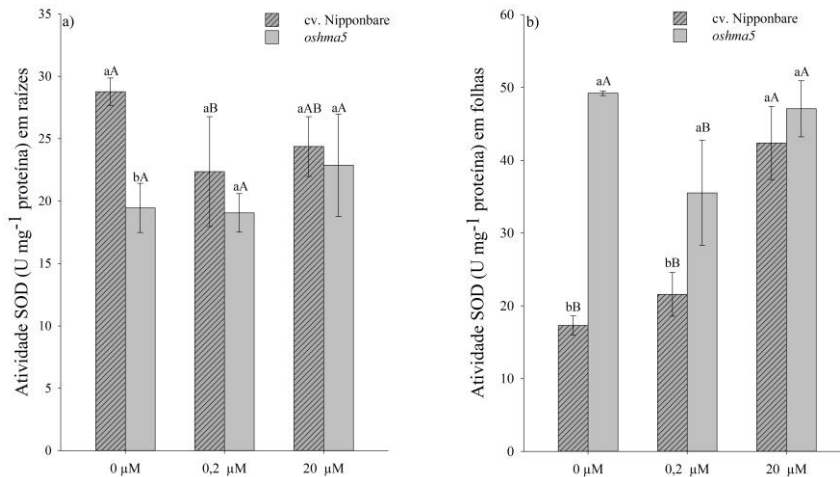
Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre o tipo selvagem e o mutante *oshma5* na mesma concentração de Cu pelo Teste t ($P < 0,05$). Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa no tipo selvagem e mutante *oshma5* em diferentes concentrações de Cu pelo Teste de Tukey ($P < 0,05$). As barras de erro representam \pm desvio padrão ($n=3$; 22 plantas cada repetição).

Atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD)

Nos tecidos de raízes o mutante *oshma5* apresentou menor atividade das enzimas SOD em relação ao tipo selvagem somente na condição de deficiência de Cu (Figura 8a). Nos tecidos foliares, o mutante *oshma5* apresentou maior atividade das enzimas SOD em comparação ao tipo selvagem na condição de deficiência e controle (0,2 μ M) de Cu (Figura 8b). A maior

atividade das SOD nos tecidos foliares do tipo selvagem ocorreu em 20 μM de Cu em relação às demais concentrações de Cu (Figura 8b).

Figura 8 – Atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) em raízes (a) e em folhas (b) no tipo selvagem (cv. Nipponbare) e no mutante *oshma5* aos 13 dias de tratamento de Cu.



Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre o tipo selvagem e o mutante *oshma5* na mesma concentração de Cu pelo Teste t ($P < 0,05$). Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa no tipo selvagem e mutante *oshma5* em diferentes concentrações de Cu pelo Teste de Tukey ($P < 0,05$). As barras de erro representam \pm desvio padrão ($n=3$; 22 plantas cada repetição).

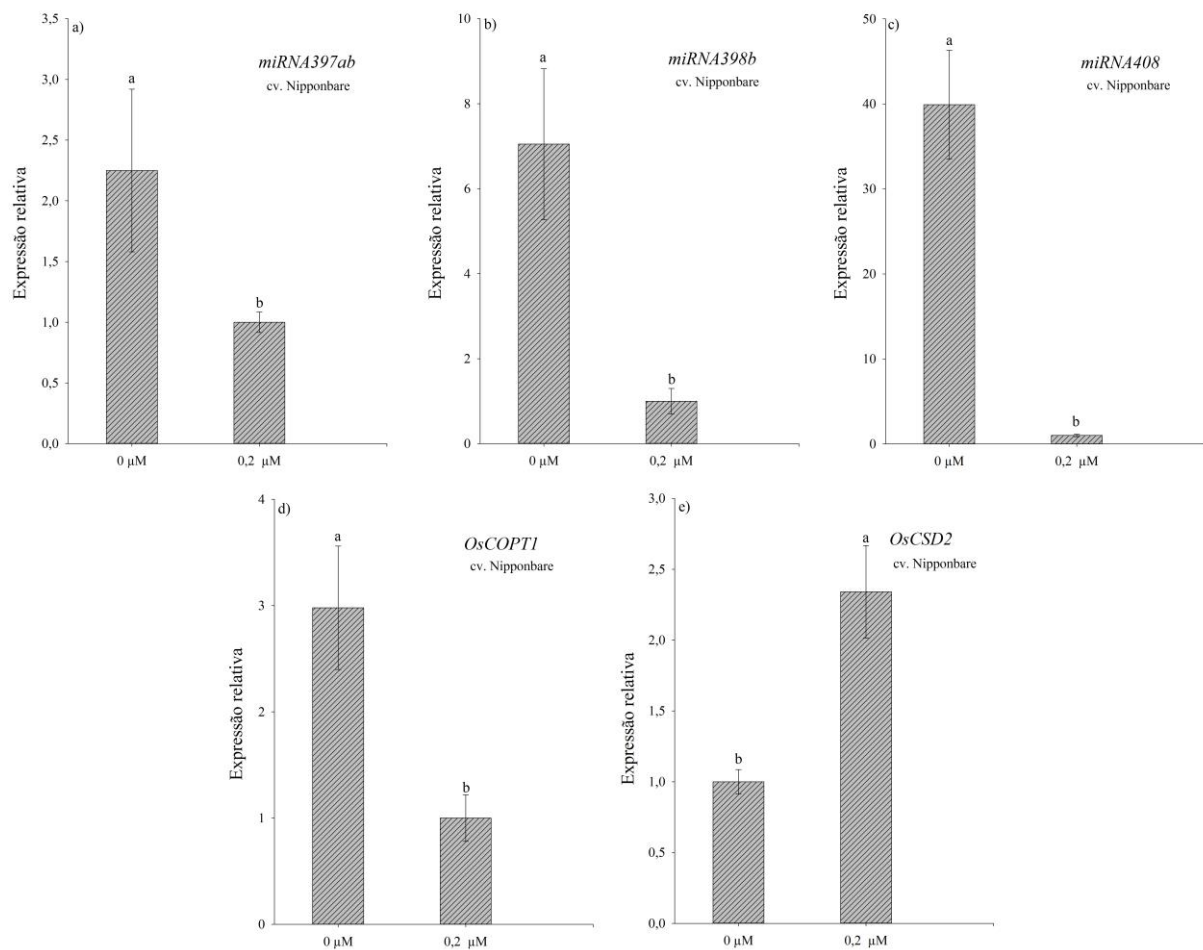
Análise de expressão gênica no tipo selvagem

Com intuito de obter informações se genes codificantes de algumas proteínas relacionadas a homeostase de Cu e miRNAs são regulados conforme a disponibilidade de Cu em arroz, foram quantificados por RT-qPCR miRNAs (*miRNA397ab*, *miRNA398b* e *miRNA408*), membros da família COPT (*OsCOPT1*, *OsCOPT5* e *OsCOPT7*) e as enzimas antioxidantes CuZnSOD (*OsCSD1* e *OsCSD2*) e FeSOD (*OsFSD1* e *OsFSD2*). Foram analisados os tecidos foliares do tipo selvagem (cv. Nipponbare) nas condições de deficiência (sem adição de Cu “0”) e controle de Cu (0,2 μM) (Figura 9).

Observou-se que o *OsCOPT1* foi induzido em deficiência de Cu (Figura 9d), já o *OsCOPT7* não diferiu entre a condição de deficiência e de controle de Cu, e ainda, não foi verificado expressão do *OsCOPT5* (dados não apresentados). Ao comparar as respostas de miRNAs em condição de deficiência de Cu em relação ao controle (0,2 μM de Cu), observou-se que os miRNAs *miRNA397ab*, *miRNA398b* e *miRNA408* foram induzidos em deficiência de

Cu nos tecidos foliares (Figura 9a; Figura 9b; Figura 9c). Além disso, apenas *OsCSD2* que codifica para a proteína cúprica CuZnSOD apresentou maior concentração de transcritos em condição controle de Cu (Figura 9e), já *OsCSD1* não apresentou regulação por Cu, assim como os genes que codificam para OsFeSODs (*OsFSD1* e *OsFSD2*), os quais parecem não ser regulados por Cu na condição experimental deste trabalho (dados não apresentados).

Figura 9 – Expressão de *miRNA397ab* (a), *miRNA398b* (b), *miRNA408* (c), *OsCOPT1* (d) e *OsCSD2* (e) no tipo selvagem (cv. Nipponbare) aos 13 dias de tratamento.



Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre as concentrações de Cu no tipo selvagem pelo Teste t ($P < 0,05$). As barras de erro representam \pm desvio padrão (n=4).

DISCUSSÃO

A concentração de Cu encontrada nos tecidos vegetais pode ser em resposta da absorção desse elemento e da taxa de crescimento das plantas, o que pode levar a uma maior ou menor diluição na biomassa vegetal (PILON, 2017). Além disso, alterações na concentração de Cu na

parte aérea também podem estar relacionadas a mudanças na rede de transporte nas raízes (DENG et al., 2013; HUANG et al., 2016). Nesse sentido, o tipo selvagem e o mutante *oshma5* não diferiram nos parâmetros de crescimento quando cultivados na presença de 20 μM de Cu (Figura 1; Figura 2). Entretanto, o mutante *oshma5* apresentou menor concentração de Cu nos tecidos de parte aérea quando comparado ao tipo selvagem em 20 μM de Cu na solução nutritiva (Figura 3a). Desse modo, menos Cu foi translocado à parte aérea no mutante *oshma5* em relação ao tipo selvagem, o que corrobora com as observações de Deng et al. (2013). Isso ocorreu, possivelmente, em decorrência da perda de função do transportador OsHMA5 (DENG et al., 2013), visto que a variação da concentração de Cu na solução nutritiva não alterou a concentração desse elemento nos tecidos de parte aérea do mutante *oshma5* (Figura 3a).

Diferente do que foi relatado por Deng et al. (2013), no presente estudo não foram encontradas diferenças significativas na concentração de Cu nos tecidos de raízes entre o tipo selvagem e o mutante *oshma5* (Figura 3b), o que pode ser explicado pelas diferenças inerentes das metodologias utilizadas. No presente estudo as raízes foram lavadas apenas com água Milli-Q, enquanto que no trabalho de Deng et al. (2013) foi utilizado CaCl_2 . No entanto, neste trabalho, assim como observado por Deng et al. (2013), há um aumento na concentração de Cu nos tecidos de raízes de ambos com o aumento da concentração de Cu na solução nutritiva (Figura 3b).

Em geral, encontra-se maior concentração de Cu em raízes em relação aos tecidos de parte aérea, como já observado em outros trabalhos para o arroz (LIDON; HENRIQUES, 1992; LIU et al., 2008; MOSTOFA; SERAJ; FUJITA, 2014), bem como para outras espécies, como milho (TIECHER et al., 2016), sorgo (ROY et al., 2017), *Arabidopsis thaliana* (LEQUEUX et al., 2010) e *Oenothera glazioviana* (WANG et al., 2017). Isso pode indicar uma baixa taxa de translocação de Cu à parte aérea (LIU et al., 2008; ROY et al., 2017; TIECHER et al., 2016; WANG et al., 2017).

Em *Arabidopsis thaliana*, parece que o transportador AtHMA5, o qual é homólogo ao OsHMA5, contribui na tolerância ao excesso de Cu (ANDRÉS-COLAS et al., 2006; DENG et al., 2013). No entanto, os resultados obtidos para o tipo selvagem e o mutante *oshma5* em relação aos parâmetros de crescimento em 20 μM de Cu evidenciam que o transportador OsHMA5 parece não contribuir na tolerância ao excesso de Cu, assim como já observado por Deng et al. (2013). Pois, mesmo que plantas do tipo selvagem tenham sido afetadas nos parâmetros de crescimento de forma mais drástica, em ambos houve redução nos parâmetros de crescimento tanto de raízes quanto de parte aérea na condição de excesso de Cu (Figura 1;

Figura 2). Além disso, como o mutante *oshma5* apresentou maiores concentrações de Cu nos tecidos de raízes com o aumento da concentração desse elemento na solução nutritiva e não ocorreu o mesmo nos tecidos de parte aérea, sugere-se que até 20 μM de Cu na solução nutritiva o transportador OsHMA5 parece ser a principal via de transporte que facilita a chegada de Cu à parte aérea, corroborando com o que foi observado por Deng et al. (2013).

Sabe-se que maiores concentrações de Cu podem alterar a absorção e transporte de outros elementos minerais em plantas (ALAOUI-SOSSÉ et al., 2004; JANICKA-RUSSAK et al., 2008). Observou-se que no tipo selvagem e no mutante *oshma5* houve uma redução na concentração de Mn nos tecidos de raízes com o aumento da concentração de Cu na solução nutritiva (Figura 3f), o que também já foi observado em *Populus trichocarpa* (RAVET et al., 2011), sorgo (ROY et al., 2017) e *Arabidopsis thaliana* (LEQUEUX et al., 2010).

O excesso de Cu pode estar relacionado com a redução da concentração de elementos minerais nos tecidos foliares, por exemplo de Fe e Mg (ALAOUI-SOSSÉ et al., 2004; CAMBROLLÉ et al., 2013; YRUELA, 2009). No entanto, no presente trabalho isso não foi observado (Figura 3c; Figura 3d). Na concentração de 20 μM de Cu na solução nutritiva, observou-se nos tecidos de parte aérea no mutante *oshma5* menores concentrações de Mg, Fe e Zn em relação ao tipo selvagem, porém maior concentração de K (Figura 3).

Andrés-Bordería et al. (2017) demonstraram que alguns genes relacionados à deficiência e homeostase de Fe, como o codificante para o fator de transcrição OsIRO2 e para nicotianamina sintase (*OsNAS2*), são induzidos na parte aérea de plantas de arroz submetidas ao excesso de Cu (75 μM). Dessa forma, essa pode ser uma possível explicação para a maior concentração de Fe nos tecidos de parte aérea de plantas do tipo selvagem na presença de 20 μM de Cu e ainda, como houve menor concentração de Fe nas raízes no tipo selvagem nessa concentração de Cu pode ter ocorrido maior translocação de Fe das raízes à parte aérea.

A maior concentração de Cu^+ no citosol em raízes de *Arabidopsis thaliana* pode implicar em maior concentração de EROs, as quais podem ativar canais de efluxo de K^+ (RODRIGO-MORENO et al., 2013). Nesse contexto, também pode-se observar maior concentração de H_2O_2 em raízes do mutante *oshma5* em excesso de Cu (Figura 7a). Assim, essa pode ser uma possível explicação para a menor concentração de K nos tecidos de raízes do mutante *ohsma5* (Figura 3h). Além disso, a maior concentração de K encontrada nos tecidos de parte aérea do mutante *oshma5* pode ser em consequência de uma maior translocação desse elemento mineral das raízes à parte aérea (Figura 3g; Figura 3h). Já no tipo selvagem, houve menor concentração de K nos tecidos de raízes e de parte aérea com o excesso de Cu, visto que

o excesso de metais pesados na solução nutritiva e no simplasto, como o Cu, pode causar danos à membrana plasmática através da interação com grupos específicos da membrana (JANICKA-RUSSAK et al., 2008). Por consequência, pode ocorrer um aumento na permeabilidade da membrana, o que pode resultar em alteração da homeostase de íons e prejuízo ao metabolismo (JANICKA-RUSSAK et al., 2008; LIDON; HENRIQUES, 1992).

Com relação aos pigmentos fotossintéticos, sabe-se que tanto a deficiência como o excesso de Cu podem afetar negativamente a concentração de clorofila (YRUELA, 2005; YRUELA, 2009). Os resultados obtidos para o tipo selvagem e mutante *oshma5* em condição de excesso de Cu sugerem que não houve prejuízos nas concentrações de clorofila *a* e carotenoides (Figura 4). Por outro lado, em deficiência de Cu, o mutante *oshma5* apresentou menor concentração de carotenoides, clorofila *a*, clorofila *b* e, por consequência, de clorofila total em comparação ao tipo selvagem (Figura 4). Isso pode estar relacionado com a menor concentração de Cu nos tecidos de parte aérea do mutante *oshma5* em relação ao tipo selvagem, indicando uma deficiência mais severa e prejuízo na concentração de pigmentos fotossintéticos, assim como observado em *Pisum sativum* (AYALA et al., 1992) e *Beta vulgaris* (DROPPA; TERRY; HORVATH, 1984).

A medida da fluorescência da clorofila *a* é uma forma rápida e não destrutiva de obter informações de maneira indireta sobre o processo fotossintético (MAXWELL; JOHNSON, 2000), com esse intuito foram avaliados diferentes parâmetros relacionados à fotossíntese. Em relação ao parâmetro Y(II), Cuchiaria et al. (2015) observaram uma redução nesse parâmetro a partir da PAR de 22 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Porém, neste estudo foram realizadas as medidas de Y(II) a partir de 0 e em seguida 125 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, o que não permitiu detectar respostas intermediárias (Figura 6). Aos 13 dias de tratamento em 0,2 e 20 μM de Cu, o tipo selvagem apresentou os maiores valores de Y(II), indicando que houve um maior aproveitamento da energia absorvida pelas moléculas de clorofila do PSII que pode ser destinada à fotoquímica (Figura 6) (GENTY; BRIANTAIS; BAKER, 1989; MAXWELL; JOHNSON, 2000). Entretanto, os resultados obtidos para Y(II) nas duas avaliações (aos 7 e 13 dias) para o tipo selvagem e o mutante *oshma5* mostram que com o incremento da PAR houve uma redução de Y(II) até atingir a saturação, sugerindo que as moléculas de clorofila do PSII vão conseguir aproveitar somente até determinado limite toda a radiação fornecida para ser utilizada na fotoquímica (GENTY; BRIANTAIS; BAKER, 1989; MAXWELL; JOHNSON, 2000).

Outro parâmetro avaliado foi a ETR, a qual estima a taxa de transporte de elétrons do PSII (SHIKANAI et al., 2003). Aos 7 e 13 dias do início dos tratamentos, observou-se menor

ETR no mutante *oshma5* em relação ao tipo selvagem em todas as concentrações de Cu, exceto ao se comparar com o tipo selvagem em deficiência de Cu aos 13 dias (Figura 5). A menor ETR pode estar relacionada com as menores concentrações de Cu encontradas nos tecidos de parte aérea do tipo selvagem em deficiência de Cu e no mutante *oshma5* (Figura 3a). Nesse sentido, resultados obtidos por Shikanai et al. (2003) sugerem que a menor ETR observada no mutante *paa1*, o qual induz menor concentração de Cu nos cloroplastos em *Arabidopsis*, é resultado de uma menor concentração de plastocianina na sua forma estável, o que pode estar relacionado à uma menor concentração de Cu nos cloroplastos. A redução na ETR em resposta a deficiência de Cu também foi observada em plantas de *Arabidopsis thaliana* (ABDEL-GHANY; PILON, 2008) e de *Populus trichocarpa* (RAVET et al., 2011).

Na condição de deficiência de Cu, o tipo selvagem e o mutante *oshma5* não apresentaram diferença significativa em parâmetros de crescimento, como área foliar, comprimento de raízes e na matéria seca de raízes e de parte aérea, em relação aos seus controles (0,2 μM de Cu) (Figura 1; Figura 2). Isso pode ser atribuído ao baixo crescimento vegetal durante o período de tratamento, o que pode não ter esgotado o Cu dos tecidos de reserva, corroborando com a concentração de Cu encontrada nos tecidos de parte aérea (Figura 3a). No entanto, a menor ETR encontrada no mutante *oshma5* e no tipo selvagem (na condição de deficiência de Cu aos 13 dias), pode ser em consequência das plantas estarem ajustando os seus processos metabólicos antes de iniciar sintomas visuais de deficiência de Cu (Figura 5).

Ainda, o comportamento da ETR do tipo selvagem em 20 μM de Cu não diferiu da condição de 0,2 μM de Cu aos 13 dias (Figura 5b). O tipo selvagem e o mutante *oshma5* foram sensíveis ao excesso de Cu evidenciado pelos menores valores nos parâmetros de crescimento avaliados (área foliar, comprimento de colmo, comprimento de raízes e matéria seca de raízes e parte aérea) (Figura 1; Figura 2). Dessa forma, no presente estudo os resultados de ETR demonstram que a fase fotoquímica parece não ter sido alterada em condição de excesso de Cu no tipo selvagem. Porém, houve redução de crescimento nas plantas em condições de excesso de Cu.

Burzyński e Żurek (2007) sugerem que o primeiro alvo do excesso de Cu na fotossíntese é o ciclo redutivo do carbono e, posteriormente, a cadeia de transporte de elétrons da fase fotoquímica. Nesse sentido, alguns estudos mostram que o excesso de Cu pode interferir em enzimas importantes do metabolismo redutivo do carbono, principalmente por meio da alteração da atividade de enzimas como a RUBISCO (ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase oxigenase) (LIDON; HENRIQUES, 1991), PGK (3-fosfoglicerato quinase) e GAPDH

(gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) (BURZYŃSKI; ŻUREK, 2007). Por consequência, alterações nessas enzimas podem desencadear uma menor atividade fotossintética e menor quantidade de fotoassimilados para o crescimento e desenvolvimento vegetal, o que pode ser uma possível explicação para a diminuição nos parâmetros de crescimento no tipo selvagem sem alteração na ETR em excesso de Cu neste trabalho.

Uma segunda hipótese pode ser atribuída a uma variação na partição de carbono (C) e não propriamente devido à redução no processo fotossintético. As plantas do tipo selvagem em excesso de Cu podem ter direcionado mais fotossintatos para a síntese de compostos relacionados à uma maior tolerância ao excesso de Cu, em vista de manter sua homeostase em detrimento do crescimento vegetal. Por exemplo, os fotossintatos podem estar sendo direcionados à síntese de compostos que atuam como agentes tamponantes do excesso de Cu, como as metalotioneínas, ácidos orgânicos, etc (CLEMENS, 2001; SONG et al., 2013; SUDO et al., 2008). Nesse sentido, Andrés-Bordería et al. (2017) observaram indução da expressão do gene que codifica para metalotioneína (*OsMT1c*) em arroz em resposta ao excesso de Cu na solução nutritiva.

E ainda, dentre os sintomas de toxidez do Cu, sabe-se que o excesso de íons de Cu livre pode resultar em redução de parâmetros de crescimento tanto da parte aérea quanto de raízes (BURKHEAD et al., 2009; YRUELA, 2005; YRUELA, 2009). Nesse sentido, a área foliar é um dos parâmetros de crescimento que apresentou maior sensibilidade ao excesso de Cu (Figura 1c). Vinit-Dunand et al. (2002) sugerem que a redução na área foliar de plantas submetidas ao excesso de Cu pode estar relacionada ao efeito do Cu na inibição do crescimento celular e não propriamente na redução da quantidade de açúcar em decorrência da menor atividade fotossintética, o que pode ser uma terceira possível explicação para compreender a redução dos parâmetros de crescimento neste estudo. Ainda, quando a espécie *Oenothera glazioviana* foi exposta a 50 µM de Cu, observou-se que o excesso de Cu regula negativamente proteínas relacionadas com o desenvolvimento vegetal em raízes, as quais parecem estar envolvidas na redução no crescimento (WANG et al., 2017).

A redução de parâmetros de crescimento devido ao excesso de Cu, também já foi observada em outros trabalhos (MOSTOFA; SERAJ; FUJITA, 2014; LEQUEUX et al., 2010; LIDON; HENRIQUES, 1992; LIU et al., 2008; TIECHER et al. 2016; WANG et al., 2017). O comprimento radicular é considerado um parâmetro bastante sensível ao excesso de Cu (ANDRÉS-COLÁS et al., 2006; ANDRÉS-COLAS et al., 2010; SANCENÓN et al., 2004). Neste estudo, o comprimento de raízes foi mais sensível que o comprimento de colmo em

excesso de Cu (Figura 1b; Figura 2b), possivelmente devido a maior concentração de Cu nos tecidos radiculares, assim como observado por Lequeux et al. (2010) em raízes de *Arabidopsis thaliana*. Yuan et al. (2013) observaram que em maiores concentrações de Cu ocorreu inibição da divisão e alongamento celular em *Arabidopsis thaliana*, o que parece estar relacionado com o aumento da atividade de auxina nesses locais em raízes.

No entanto, sintomas como redução na biomassa e no crescimento em plantas também podem ser desencadeados devido alterações bioquímicas e metabólicas em plantas submetidas a elevadas concentrações de Cu (WANG et al., 2017), visto que o excesso de Cu livre no citoplasma pode resultar em aumento da concentração de EROs através da reação de Haber-Weiss (RAVET; PILON, 2013). Ainda, a inibição do crescimento radicular, em consequência da maior concentração de EROs, parece ocorrer através de uma via independente da auxina (YUAN et al., 2013).

O H_2O_2 é uma das EROs que podem causar prejuízos às células em maiores concentrações e é formado quando o radical superóxido aceita um elétron (GILL et al., 2015; GILL; TUTEJA, 2010; SHARMA et al., 2012). Apenas no mutante *oshma5* ocorreu uma maior concentração de H_2O_2 nos tecidos radiculares em excesso de Cu (Figura 7a). Por outro lado, a menor concentração de H_2O_2 nos tecidos foliares do mutante *oshma5* ocorreu no excesso de Cu (Figura 7b), visto que a concentração de Cu na parte aérea não diferiu entre os tratamentos de Cu no mutante *oshma5*. No tipo selvagem houve maior concentração de H_2O_2 em deficiência de Cu nos tecidos foliares, visto que tanto a deficiência quanto o excesso de Cu podem gerar maior concentração de EROs e, por consequência, induzir o estresse oxidativo em plantas (TEWARI; KUMAR; SHARMA, 2006). Pois, como o Cu é cofator de proteínas que participam de cadeias de transporte de elétrons, a menor atividade dessas proteínas podem gerar mais EROs (TEWARI; KUMAR; SHARMA, 2006).

As enzimas SOD são consideradas entre as mais efetivas do sistema antioxidante na redução das EROs (GILL; TUTEJA, 2010), as quais são responsáveis pela conversão do $O_2^{\cdot-}$ (ânion superóxido) em H_2O_2 e O_2 , reduzindo assim a possibilidade da reação de Haber-Weiss, pois $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 são substratos para essa reação (GILL et al., 2015; GILL; TUTEJA, 2010). Nos tecidos foliares, nas condições de deficiência e controle de Cu, o mutante *oshma5* mostrou maior atividade das enzimas SODs em relação ao tipo selvagem (Figura 8b), o que pode ser uma resposta enzimática às alterações em processos fisiológicos devido a menor concentração de Cu nos seus tecidos de parte aérea (PEÑARRUBIA et al., 2015; RAVET; PILON, 2013; YRUELA, 2013). Em excesso de Cu, o tipo selvagem apresentou a maior atividade das SODs

nos tecidos foliares em relação às demais concentrações de Cu (Figura 8b), demonstrando que essas enzimas responderam ao aumento da concentração de Cu nos tecidos de parte aérea com intuito de proteger as células do potencial dano do estresse oxidativo (GILL et al., 2015; GILL; TUTEJA, 2010).

Assim, a fim de evitar prejuízos pelo excesso ou deficiência de Cu, as plantas possuem diferentes estratégias para manter a homeostase de Cu nas células. Dentre essas, em condições de deficiência de Cu, foi descrito em *Arabidopsis thaliana* o mecanismo de economia de Cu (BURKHEAD et al., 2009; PEÑARRUBIA et al., 2015). Uma das formas de regulação de proteínas cúpricas nesse mecanismo é pós-transcricionalmente via miRNAs específicos (YAMASAKI et al., 2009).

Neste trabalho, verificou-se que a deficiência de Cu afetou negativamente a expressão de *OsCSD2* (Figura 9d), sugere-se que o miRNA398 é o responsável pela sua regulação em *Arabidopsis thaliana* (ABDEL-GHANY; PILON, 2008) e em *Populus trichocarpa* (RAVET et al., 2011). Como ocorreu maior expressão do *miRNA398b* em condição de deficiência de Cu, parece que essa regulação pode ser conservada em *Oryza sativa* (Figura 9b).

Uma estratégia pelas plantas em deficiência de Cu é a substituição de proteínas cúpricas por outras equivalentes, porém dependentes de outro metal como cofator, por exemplo as CuZnSODs pelas FeSODs (ABDEL-GHANY et al., 2005; ABDEL-GHANY; PILON, 2008; BURKHEAD et al., 2009). Assim, sabe-se que há uma indução nos genes que codificam para FeSODs em deficiência de Cu em *Arabidopsis* (ABDEL-GHANY et al., 2005), e ainda, essa regulação ocorre através da ligação do SPL7 numa sequência específica da região do promotor dos genes (YAMASAKI et al., 2009). Porém, os transcritos de *OsFeSODs* não demonstraram regulação pela variação da disponibilidade de Cu neste trabalho (dados não apresentados). Nesse sentido, Cohu e Pilon (2007) observaram que em *Oryza sativa*, em condição de deficiência e controle de Cu, o conteúdo de CuZnSOD e FeSOD parece não alterar (COHU; PILON, 2007). Ravet et al. (2011) sugerem que essa regulação das SODs pode não ser uma resposta universal em plantas, pois também não observaram alteração nos transcritos de genes de FeSODs em *Populus trichocarpa*. Outra explicação pode estar associada à concentração de Cu em deficiência de Cu não ter sido esgotada suficientemente para causar essa regulação (COHU; PILON, 2007).

Em *Arabidopsis* o miRNA397 tem como alvos especificamente lacases (*LAC2*, *LAC4* e *LAC17*) (ABDEL-GHANY; PILON, 2008; YAMASAKI et al., 2009; WANG et al., 2014). Em arroz, sabe-se que o miR397 reduz a expressão de *OsLAC*, o qual também codifica para lacase

(JEONG et al., 2011; ZHANG et al., 2013). Neste trabalho, observou-se que o *miRNA397ab* apresentou maior expressão em deficiência de Cu, assim pode estar atuando na redução do consumo de Cu a partir da regulação negativa de proteínas cúpricas específicas (BURKHEAD et al., 2009). Nesse sentido, o *miRNA408* também apresentou maior expressão em deficiência de Cu, o qual é responsável pela regulação dos transcritos de *LAC13* e *ARPN* (plastocianina) em *Arabidopsis* (ABDEL-GHANY; PILON, 2008; ZHANG; LI, 2013).

Neste trabalho, houve indução de miRNAs em deficiência de Cu, os quais podem estar envolvidos na redução do uso do Cu por proteínas menos essenciais ao metabolismo vegetal para priorizá-lo a proteínas essenciais, como a plastocianina (BURKHEAD et al., 2009), a qual participa na cadeia de transporte de elétrons da fotossíntese (YRUELA, 2013). No entanto, plantas do tipo selvagem apresentaram uma redução drástica na ETR em deficiência de Cu (Figura 5b), esse resultado também foi observado por Ravet et al. (2011) em *Populus trichocarpa*. Esses autores observaram que em deficiência de Cu houve redução do conteúdo de plastocianina, porém o conteúdo da subunidade COXII da proteína citocromo *c* oxidase não foi afetada pela variação de Cu, visto que também é uma proteína que possui o Cu como cofator (CARR; WINGE, 2003; RAVET et al., 2011). Assim, os autores sugeriram que na condição de deficiência de Cu, em *Populus trichocarpa* o Cu é direcionado com prioridade à citocromo *c* oxidase, a qual participa na cadeia de transporte de elétrons da respiração (CARR; WINGE, 2003), e posteriormente à plastocianina (RAVET et al., 2011). Ainda, ao se fornecer Cu novamente, dentre as proteínas cúpricas, a plastocianina foi a primeira a reestabelecer sua atividade (RAVET et al., 2011). Desse modo, isso também pode ser uma hipótese do que ocorre em *Oryza sativa* com base nos resultados de ETR e indução de miRNAs neste trabalho.

Outra resposta para manter a homeostase de Cu, em condições de deficiência, é aumentar a expressão de genes que codificam para transportadores envolvidos na absorção de Cu em plantas (BERNAL et al., 2012). Os transportadores da família COPT, em geral, são envolvidos na absorção de Cu nas células (PUIG, 2014). Yuan et al. (2011) observaram que os genes *OsCOPT1*, *OsCOPT5* e *OsCOPT7* são induzidos em deficiência de Cu tanto em raízes quanto na parte aérea. Nesse sentido, observou-se que *OsCOPT1* apresentou maior expressão em deficiência de Cu aos 13 dias de tratamento em plantas do tipo selvagem (Figura 9d), o que também já foi observado por Andrés-Bordería et al. (2017) em *Oryza sativa*, indicando ser um bom marcador para condições de deficiência de Cu e da concentração de Cu no simplasto (ANDRÉS-BORDERÍA et al., 2017). Porém, diferente do que foi encontrado por Yuan et al.

(2011), não foi observado expressão de *OsCOPT5* (dados não apresentados), já Andrés-Bordería et al. (2017) não observaram regulação desse gene ao Cu.

CONCLUSÕES

Em resposta a deficiência de Cu, plantas do tipo selvagem responderam sob aspectos moleculares e metabólicos, como a maior expressão de *OsCOPT1* e menor ETR e Y(II), antes de demonstrarem possíveis efeitos secundários como a diminuição de crescimento das plantas. Além disso, o tipo selvagem na condição de deficiência de Cu apresentou o mesmo comportamento do mutante *oshma5* nos parâmetros ETR e Y(II). No tipo selvagem, os miRNAs analisados (*miRNA397ab*, *miRNA398b* e *miRNA408*) são induzidos em deficiência de Cu, sendo assim parece que o mecanismo para priorizar o uso de Cu pelo metabolismo vegetal é conservado em *Oryza sativa*.

A maior concentração de Cu na solução nutritiva provocou alteração na absorção e distribuição de elementos minerais no tipo selvagem e no mutante *oshma5*. Ainda, a maior concentração de Cu na solução nutritiva ocasionou efeitos negativos em parâmetros de crescimento no tipo selvagem e no mutante *oshma5*, evidenciando que o transportador OsHMA5 parece não contribuir de modo significativo à tolerância ao excesso de Cu.

REFERÊNCIAS

ABDEL-GHANY, S. E. et al. Two P-Type ATPases Are Required for Copper Delivery in *Arabidopsis thaliana* Chloroplasts. **The Plant Cell**, v. 17, p.1233-1251, 2005.

ABDEL-GHANY, S. E.; PILON, M. MicroRNA-mediated Systemic Down-regulation of Copper Protein Expression in Response to Low Copper Availability in *Arabidopsis*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 283, p. 15932-15945, 2008.

ADREES, M. et al. The effect of excess copper on growth and physiology of important food crops: a review. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, p. 8148-8162, 2015.

ALAOUI-SOSSÉ, B. et al. Effect of copper on growth in cucumber plants (*Cucumis sativus*) and its relationships with carbohydrate accumulation and changes in ion contents. **Plant Science**, v. 166, p. 1213-1218, 2004.

ANDRÉS-BORDERÍA, A. et al. Copper and ectopic expression of the *Arabidopsis* transport protein COPT1 alter iron homeostasis in rice (*Oryza sativa* L.). **Plant Molecular Biology**, v. 95, p. 17-32, 2017.

- ANDRÉS-COLÁS, N. et al. The Arabidopsis heavy metal P-type ATPase HMA5 interacts with metallochaperones and functions in copper detoxification of roots. **The Plant Journal**, v. 45, p. 225-236, 2006.
- ANDRÉS-COLÁS, N. et al. Deregulated Copper Transport Affects *Arabidopsis* Development Especially in the Absence of Environmental Cycles. **Plant Physiology**, v. 153, p. 170-184, 2010.
- AXELSEN, K. B.; PALMGREN, M. G. Evolution of Substrate Specificities in the P-Type ATPase Superfamily. **Journal of Molecular Evolution**, v. 46, p. 84-101, 1998.
- AYALA, M. B. et al. Changes in carotenoids and fatty acids in photosystem II of Cu deficient pea plants. **Physiologia Plantarum**, v. 84, p. 1-5, 1992.
- BERNAL, M. et al. Transcriptome sequencing identifies SPL7-regulated copper acquisition genes *FRO4/FRO5* and copper dependence of iron homeostasis in Arabidopsis. **Plant Cell**, v. 24, p. 738-761, 2012.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BURKHEAD, J. L. et al. Copper homeostasis. **New Phytologist**, v. 182, p. 799-816, 2009.
- BURZYŃSKI, M.; ŻUREK, A. Effects of copper and cadmium on photosynthesis in cucumber cotyledons. **Photosynthetica**, v. 45, p. 239-244, 2007.
- CAMBROLLÉ, J. et al. Growth and photosynthetic responses to copper in wild grapevine. **Chemosphere**, v. 93, p. 294-301, 2013.
- CARR, H. S.; WINGE, D. R. Assembly of Cytochrome *c* Oxidase within the Mitochondrion. **Accounts of Chemical Research**, v. 36, p. 309-316, 2003.
- CLEMENS, S. Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. **Planta**, v. 212, p. 475-86, 2001.
- COHU, C. M.; PILON, M. Regulation of superoxide dismutase expression by copper availability. **Physiologia Plantarum**, v. 129, p. 747-755, 2007.
- COUNCE, P. A.; KEISLING, T. C.; MITCHELL, A. J. A Uniform, Objective, and Adaptive System for Expressing Rice Development. **Crop Science**, v. 40, p. 436-443, 2000.
- CUCHIARA, C. C. et al. Chlorophyll *a* fluorescence in sweet potatoes under different copper concentrations. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v. 15, p. 179-189, 2015.
- DENG, F. et al. A member of the heavy metal P-Type ATPase OsHMA5 is involved in xylem loading of copper in rice. **Plant Physiology**, v. 163, p. 1353-1362, 2013.

- DROPPA, M.; TERRY, N.; HORVATH, G. Effects of Cu deficiency on photosynthetic electron transport. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 81, p. 2369-2373, 1984.
- FERREIRA, D. F. Análise estatística por meio do sisvar para Windows versão 4.0. In: Reunião Brasileira da Sociedade Internacional de Biometria, v. 45, São Carlos, p. 235, 2000.
- FERREIRA, P. A. et al. A. *Rhizophagus clarus* and phosphate alter the physiological responses of *Crotalaria juncea* cultivated in soil with a high Cu level. **Applied Soil Ecology**, v. 91, p. 37-47, 2015.
- GENTY, B.; BRIANTAIS, J. M.; BAKER, N. R. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 990, p. 87-92, 1989.
- GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxidedismutase I. Occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, v. 59, p. 309-314, 1977.
- GILL, S. S. et al. Superoxide dismutase—mentor of abiotic stress tolerance in crop plants. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 14, p. 10375-10394, 2015.
- GILL, S.S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 48, p. 909-930, 2010.
- HISCOX J. D.; ISRAELSTAM G. F. A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. **Canadian Journal of Botany**, v. 57, p. 1132-1334, 1979.
- HUANG, X. Y. et al. A heavy metal P-type ATPase OsHMA4 prevents copper accumulation in rice grain. **Nature Communications**, v. 7, p. 1-13, 2016.
- ISHIMARU, Y. et al. OsZIP4, a novel zinc-regulated zinc transporter in rice. **Journal of Experimental Botany**, v. 56, p. 3207-3214, 2005.
- JAIN, M. et al. Validation of housekeeping genes as internal control for studying gene expression in rice by quantitative real-time PCR. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 345 p. 646-651, 2006.
- JANICKA-RUSSAK, M. et al. Response of plasma membrane H⁺-ATPase to heavy metal stress in *Cucumis sativus* roots. **Journal of Experimental Botany**, v. 59, p. 3721-3728, 2008.
- JEONG, D. H. et al. Massive Analysis of Rice Small RNAs: Mechanistic Implications of Regulated MicroRNAs and Variants for Differential Target RNA Cleavage. **The Plant Cell**, v. 23, p. 4185-4207, 2011.
- LEQUEUX, H. et al. Response to copper excess in *Arabidopsis thaliana*: Impact on the root system architecture, hormone distribution, lignin accumulation and mineral profile. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 48, p. 673-682, 2010.
- LICHTENTHALER, H. K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. **Method Enzymology**, v. 148, p. 350-382, 1987.

- LIDON, F. C.; HENRIQUES, F. S. Effects of increasing concentrations of Cu on metal uptake kinetics and biomass yields. **Soil Science**, v. 154, p. 44-49, 1992.
- LIDON, F. C.; HENRIQUES, F. S. Limiting Step on Photosynthesis of Rice Plants Treated with Varying Copper Levels. **Journal of Plant Physiology**, v. 138, p. 115-118, 1991.
- LIU, H. et al. Identification of Rice Varieties with High Tolerance or Sensitivity to Copper. **Journal of Plant Nutrition**, v. 31, p. 121-136, 2008.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Method. **Methods**, v. 25, p. 402-408, 2001.
- LORETO, F.; VELIKOVA, V. Isoprene produced by leaves protects the photosynthetic apparatus against ozone damage, quenches ozone products, and reduces lipid peroxidation of cellular membranes. **Plant Physiology**, v. 127, p. 1781-1787, 2001.
- MARSCHNER H. **Mineral nutrition of higher plants**. 2^a ed. UK: Academic Press, 1995. 889 p.
- MARSCHNER, H. **Marschner's mineral nutrition of higher plants**. 3^a ed. New York: Academic Press, 2012. 651p.
- MAXWELL, K.; JOHNSON, G. N. Chlorophyll fluorescence—a practical guide. **Journal of Experimental Botany**, v. 51, p. 659-668, 2000.
- MIGOCKA, M. Copper-transporting ATPases: the evolutionarily conserved machineries for balancing copper in living systems. **International Union of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 67, p. 737-745, 2015.
- MOSTOFA, M. G.; SERAJ, Z. I.; FUJITA, M. Exogenous sodium nitroprusside and glutathione alleviate copper toxicity by reducing copper uptake and oxidative damage in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. **Protoplasma**, v. 251, p. 1373-1386, 2014.
- PEÑARRUBIA, L. et al. Regulation of copper transport in *Arabidopsis thaliana*: a biochemical oscillator? **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 15, p. 29-36, 2010.
- PEÑARRUBIA L. et al. Temporal aspects of copper homeostasis and its crosstalk with hormones. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, p. 1-18, 2015.
- PILON, M. The copper microRNAs. **New Phytologist**, v. 213, p. 1030-1035, 2017.
- PRINTZ, B. et al. Copper Trafficking in Plants and Its Implication on Cell Wall Dynamics. **Frontiers in Plant Science**, v.7, p. 1-16, 2016.
- PUIG, S. Function and regulation of the plant COPT family of high-affinity copper transport proteins. **Hindawi Publishing Corporation Advances in Botany**, v. 2014, p. 1-9, 2014.

- RASCHER, U.; LIEBIG, M.; LÜTTGE, U. Evaluation of instant light-response curves of chlorophyll fluorescence parameters obtained with a portable chlorophyll fluorometer on site in the field. **Plant, Cell and Environment**, v. 23, p. 1397-1405, 2000.
- RAVET, K. et al. Spatiotemporal Analysis of Copper Homeostasis in *Populus trichocarpa* Reveals an Integrated Molecular Remodeling for a Preferential Allocation of Copper to Plastocyanin in the Chloroplasts of Developing Leaves. **Plant Physiology**, v. 157, p. 1300-1312, 2011.
- RAVET, K.; PILON, M. Copper and Iron Homeostasis in Plants: The Challenges of Oxidative Stress. **Antioxidants & Redox signaling**, v. 19, p. 919-932, 2013.
- RICACHENEVSKY, F. 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 Biology**, v. 11, p. 1-22, 2011.
- RODRIGO-MORENO, A. et al. Calcium- and potassium-permeable plasma membrane transporters are activated by copper in Arabidopsis root tips: linking copper transport with cytosolic hydroxyl radical production. **Plant, Cell and Environment**, v. 36, p. 844-855, 2013.
- ROY, S. K. et al. Proteome characterization of copper stress responses in the roots of sorghum. **Biometals**, v. 30, p. 765-785, 2017.
- SANCENÓN, V. et al. The Arabidopsis copper transporter COPT1 functions in root elongation and pollen development. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p. 15348-15355, 2004.
- SHARMA, P. et al. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. **Hindawi Publishing Corporation Journal of Botany**, v. 2012, p. 1-26, 2012.
- SHIKANAI, T. et al. PAA1, a P-Type ATPase of Arabidopsis, functions in copper transport in chloroplasts. **The Plant Cell**, v. 15, p. 1333-1346, 2003.
- SONG, Y. et al. Proteomic analysis of copper stress responses in the roots of two rice (*Oryza sativa* L.) varieties differing in Cu tolerance. **Plant Soil**, v. 366, p. 647-658, 2013.
- SUDO, E. et al. Gene expression and sensitivity in response to copper stress in rice leaves. **Journal of Experimental Botany**, v. 59, p. 3465-3474, 2008.
- TEWARI, R. K.; KUMAR, P.; SHARMA, P. N. Antioxidant responses to enhanced generation of superoxide anion radical and hydrogen peroxide in the copper-stressed mulberry plants. **Planta**, v. 223, p. 1145-1153, 2006.
- TIECHER, T. L. et al. Effects of zinc addition to a copper-contaminated vineyard soil on Sorption of Zn by soil and plant physiological responses. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 129, p. 109-119, 2016.
- VINIT-DUNAND, F. et al. Effects of copper on growth and on photosynthesis of mature and expanding leaves in cucumber plants. **Plant Science**, v. 163, p. 53-58, 2002.

- WANG, C. et al. Proteomic analysis on roots of *Oenothera glazioviana* under copper-stress conditions. **Scientific Reports**, v. 7, p. 1-12, 2017.
- WANG, C. Y. et al. MiR397b regulates both lignin content and seed number in Arabidopsis via modulating a laccase involved in lignin biosynthesis. **Plant Biotechnology Journal**, v. 12, p. 1132-1142, 2014.
- WILLIAMS, L. E.; MILLS, R. F. P_(1B)-ATPases: an ancient family of transition metal pumps with diverse functions in plants. **Trends in Plant Science**, v. 10, p. 491-502, 2005.
- YAMASAKI, H. et al. *SQUAMOSA* Promoter Binding Protein-Like7 Is a Central Regulator for Copper Homeostasis in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, v. 21, p. 347-361, 2009.
- YAMASAKI, H.; PILON, M.; SHIKANAI, T. How do plants respond to copper deficiency? **Plant Signaling & Behavior**, v. 3, p. 231-232, 2008.
- YRUELA, I. Copper in plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 171, p. 145-156, 2005.
- YRUELA, I. Copper in plants: acquisition, transport and interactions. **Functional Plant Biology**, v. 36, p. 409-430, 2009.
- YRUELA, I. Transition metals in plant photosynthesis. **Metallomics**, v. 5, p. 1090-1109, 2013.
- YUAN, H. M. et al. Copper Regulates Primary Root Elongation Through PIN1-Mediated Auxin Redistribution. **Plant Cell Physiology**, v. 54, p. 766-778, 2013.
- YUAN, M. et al. Molecular and functional analyses of COPT/Ctr-type copper transporter-like gene family in rice. **BMC Plant Biology**, v. 11, p. 1-12, 2011.
- ZHANG, J. P. et al. miRNA MiR408 regulates grain yield and photosynthesis via a phytoeyanin protein. **Plant Physiology**, v. 175, p. 1175-1185, 2017.
- ZHANG, H.; LI, L. *SQUAMOSA* promoter binding protein-like7 regulated microRNA408 is required for vegetative development in Arabidopsis. **The Plant Journal**, v. 74, p. 98-109, 2013.
- ZHANG, Y. C. et al. Overexpression of microRNA OsmiR397 improves rice yield by increasing grain size and promoting panicle branching. **Nature biotechnology**, v. 31, p. 849-854, 2013.
- ZHU, Z. et al. Silicon alleviates salt stress and increases antioxidant enzymes activity in leaves of salt stressed cucumber (*Cucumis sativus* L.). **Plant Science**, v. 167, p. 527-533, 2004.

MATERIAL SUPLEMENTAR

Quadro 1 – Primers utilizados neste trabalho.

Nome do Primer	Sequência do Primer (5' - 3')
OSCOPT1_F	CATGGGCGCCATGAAGTC
OSCOPT1_R	GTGAAGAGCACCTCCGAGTTCT
OSCOPT5_F	GCTGTCTCGCTCGTCATGGT
OSCOPT5_R	CGCACACACAAAACATCAACAA
OSCOPT7_F	GCCTAGGGTTTGGCTTTGC
OSCOPT7_R	ACAAGATCGGGAAACCAAACA
OSUBQ5_F	ACCACTTCGACCGCCACTACT
OSUBQ5_R	ACGCCTAAGCCTGCTGGTT
OSCSD1_F	AGCTGTTGTTGTCCATGCTG
OSCSD1_R	CTAACCCTGGAGTCCGATGA
OSCSD2_F	GGTGGCCATGAGCTTAGTCT
OSCSD2_R	AAAAAGGGTGACATGGATGC
OSFSD1_F	GAGGCTTTTGTGAACCTTGG
OSFSD1_R	GATTGCCTCACGTGCTCAT
OSFSD2_F	GAGCTATGCCTCAGCAGGTC
OSFSD2_R	GCTTACTTGGCTCCGTTGTC
MIRNA398A_F	GGCGGTGTGTTCTCAGGTCA
MIRNA398B_F	GGCGGTGTGTTCTCAGGTCG
MIRNA408_F	CCGCTGCACTGCCTCTTC
MIRNA397AB_F	GGCCTCATTGAGTGCAGCG
MIRNA_UNIV_R	GTGCAGGGTCCGAGGT

Tabela 1 – Concentração de Zn, Mn, Mg, Ca e P nos tecidos de raízes e da última folha completamente expandida no tipo selvagem (cv. Nipponbare) e mutante *oshma5* cultivados em solução nutritiva aos 13 dias de tratamento.

		Concentração no tecido				
		Raízes				
		Zn ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Mn ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Mg ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Ca ($\mu\text{g g}^{-1}$)	P ($\mu\text{g g}^{-1}$)
cv. Nipponbare	0	169.56 bB	648.98 aA	9021.58 aA	4174.63 aA	15940.39 aA
	0.2	270 aA	368.77 aB	5772.73 bB	4644.10 aA	15649.01 aA
	20	198.78 aB	184.88 aC	8746.89 aA	4090.86 aA	10925.98 aB
<i>oshma5</i>	0	308.49 aA	618.51 aA	8550.01 aB	4468.03 aAB	15891.92 aA
	0.2	302.47 aA	436.3 aB	7718.51 aB	4592.17 aA	15115.82 aA
	20	183.07 aB	196.79 aC	10916.62 aA	3538.5 aB	12017.62 aA
	CV(%)	12.14	12.7	17.5	14.65	17.61
		Última folha completamente expandida				
cv. Nipponbare	0	80.03 aB	1131.14 aAB	5410.52 aB	9221.89 aA	9323.74 aA
	0.2	93.31 aB	1029.13 aB	4323.89 aB	6996.12 aB	7241.78 aB
	20	114.59 aA	1309.07 aA	10774.96 aA	7415.53 aB	8254.21 aAB
<i>oshma5</i>	0	73.7 aA	1048.62 aA	4955.29 aA	7485.63 bA	8289.69 aA
	0.2	76.24 bA	960.26 aA	4537.67 aA	5514.53 bB	8380.14 aA
	20	69.71 bA	1152.44 aA	5069.26 bA	6810.48 aAB	8382.39 aA
	CV(%)	11.7	15.17	13.87	14.55	11.55

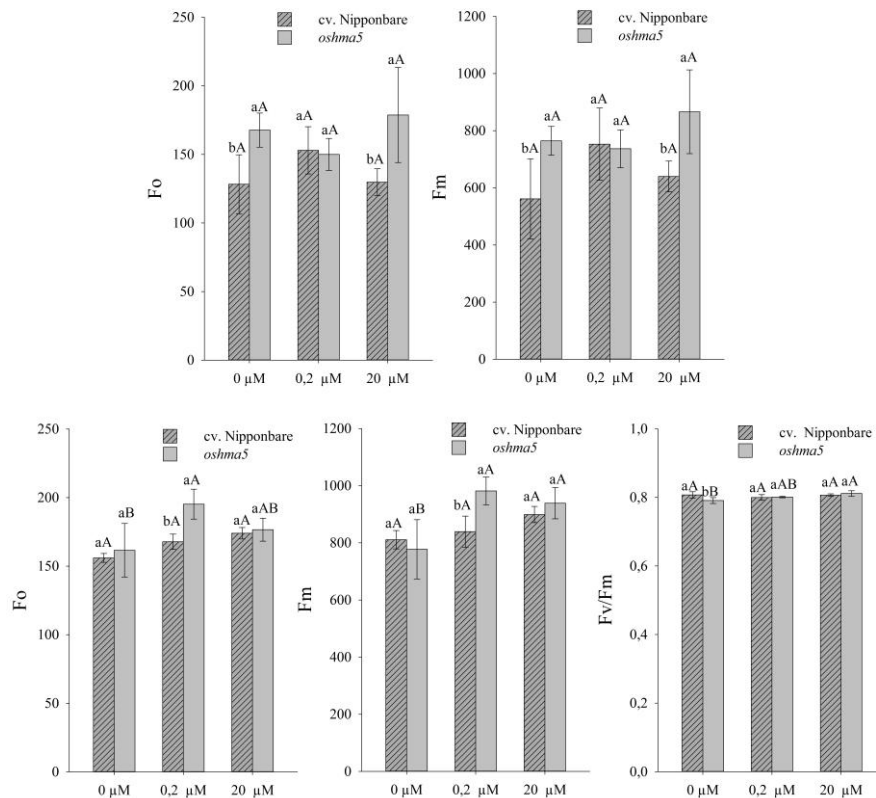
Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre o tipo selvagem e o mutante *oshma5* na mesma concentração de Cu pelo Teste t ($P < 0,05$). Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa no tipo selvagem e mutante *oshma5* em diferentes concentrações de Cu pelo Teste de Tukey ($P < 0,05$) ($n=5$).

Figura 10 – Plantas no momento da transferência às unidades experimentais, tipo selvagem (à esquerda) e mutante *oshma5* (à direita).



Fonte: (DEL FRARI, B. K. 2017).

Figura 11 – Fluorescência inicial (F_0) no tipo selvagem (cv. Nipponbare) e mutante *oshma5* aos 7 dias (a) e 13 dias (c) de tratamento. Fluorescência máxima (F_m) no tipo selvagem (cv. Nipponbare) e mutante *oshma5* aos 7 dias (b) e 13 dias (d) de tratamento. Rendimento quântico máximo do PSII (F_v/F_m) no tipo selvagem (cv. Nipponbare) e mutante *oshma5* aos 13 dias de tratamento (e).



Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre o tipo selvagem e o mutante *oshma5* na mesma concentração de Cu pelo Teste t ($P < 0,05$). Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa no tipo selvagem e mutante *oshma5* em diferentes concentrações de Cu pelo Teste de Tukey ($P < 0,05$). As barras de erro representam \pm desvio padrão (7 dias, $n=4$; 13 dias, $n=5$).

REFERÊNCIAS

- ABDEL-GHANY, S. E. Contribution of plastocyanin isoforms to photosynthesis and copper homeostasis in *Arabidopsis thaliana* grown at different copper regimes. **Planta**, v. 229, p. 767-779, 2009.
- ABDEL-GHANY, S. E. et al. Two P-Type ATPases are Required for Copper Delivery in *Arabidopsis thaliana* Chloroplasts. **The Plant Cell**, v. 17, p.1233-1251, 2005.
- ABDEL-GHANY, S. E.; PILON, M. MicroRNA-mediated Systemic Down-regulation of Copper Protein Expression in Response to Low Copper Availability in *Arabidopsis*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 283, p. 15932-15945, 2008.
- ADREES, M. et al. The effect of excess copper on growth and physiology of important food crops: a review. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, p. 8148-8162, 2015.
- ANDREAZZA, R. et al. Bacterial stimulation of copper phytoaccumulation by bioaugmentation with rhizosphere bacteria. **Chemosphere**, v. 81, p. 1149-1154, 2010.
- ANDO, Y. et al. Copper in xylem and phloem saps from rice (*Oryza sativa*): the effect of moderate copper concentrations in the growth medium on the accumulation of five essential metals and a speciation analysis of copper-containing compounds. **Functional Plant Biology**, v. 40, p. 89-100, 2012.
- ANDRÉS-COLÁS, N. et al. The Arabidopsis heavy metal P-type ATPase HMA5 interacts with metallochaperones and functions in copper detoxification of roots. **The Plant Journal**, v. 45, p. 225-236, 2006.
- ARGÜELLO, J. M. Identification of Ion-Selectivity Determinants in Heavy-Metal Transport P_{1B}-type ATPases. **The Journal of Membrane Biology**, v. 195, p. 93-108, 2003.
- AXELSEN, K. B.; PALMGREN, M. G. Evolution of Substrate Specificities in the P-Type ATPase Superfamily. **Journal of Molecular Evolution**, v. 46, p. 84-101, 1998.
- AXELSEN, K. B.; PALMGREN, M. G. Inventory of the Superfamily of P-Type Ion Pumps in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v. 126, p. 696-706, 2001.
- AYALA, M. B. et al. Changes in carotenoids and fatty acids in photosystem II of Cu deficient pea plants. **Physiologia Plantarum**, v. 84, p. 1-5, 1992.
- BERNAL, M. et al. Transcriptome sequencing identifies SPL7-regulated copper acquisition genes *FRO4/FRO5* and copper dependence of iron homeostasis in *Arabidopsis*. **Plant Cell**, v. 24, p. 738-761, 2012.
- BLABY-HAAS, C. E. et al. Evolution of a plant-specific copper chaperone family for chloroplast copper homeostasis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America USA**, v. 111, p. E5480-E5487, 2014.

- BRUNETTO, G. et al. Copper accumulation in vineyard soils: Rhizosphere processes and agronomic practices to limit its toxicity. **Chemosphere**, v. 162, p. 293-307, 2016.
- BURKHEAD, J. L. et al. Copper homeostasis. **New Phytologist**, v. 182, p. 799-816, 2009.
- CARR, H. S.; WINGE, D. R. Assembly of Cytochrome *c* Oxidase within the Mitochondrion. **Accounts of Chemical Research**, v. 36, p. 309-316, 2003.
- CLEMENS, S. Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. **Planta**, v. 212, p. 475-86, 2001.
- CONA, A. et al. Functions of amine oxidases in plant development and defence. **Trends in Plant Science**, v.11, p. 80-88, 2006.
- CURIE, C. et al. Maize *yellow stripe1* encodes a membrane protein directly involved in Fe (III) uptake. **Nature**, v. 409, p. 346-349, 2001.
- CURIE, C. et al. Metal movement within the plant: contribution of nicotianamine and yellow stripe 1-like transporters. **Annals of Botany**, v. 103, p. 1-11, 2009.
- DEL POZO, T.; CAMBIAZO, V.; GONZÁLEZ, M. Gene expression profiling analysis of copper homeostasis in *Arabidopsis thaliana*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 393, p. 248-252, 2010.
- DENG, F. et al. A member of the heavy metal P-Type ATPase OsHMA5 is involved in xylem loading of copper in rice. **Plant Physiology**, v. 163, p. 1353-1362, 2013.
- DONG, J.; KIM, S. T.; LORD, E. M. Plantacyanin Plays a Role in Reproduction in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v. 138, p. 778-789, 2005.
- DROPPA, M. et al. Characteristics of Cu deficiency-induced inhibition of photosynthetic electron transport in spinach chloroplasts. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 891, p. 75-84, 1987.
- DROPPA, M.; TERRY, N.; HORVATH, G. Effects of Cu deficiency on photosynthetic electron transport. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 81, p. 2369-2373, 1984.
- GARCIA-MOLINA, A. et al. The intracellular *Arabidopsis* COPT5 transport protein is required for photosynthetic electron transport under severe copper deficiency. **Plant Journal**, v. 65, p. 848-860, 2011.
- GILL, S. S. et al. Superoxide dismutase—mentor of abiotic stress tolerance in crop plants. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 14, p. 10375-10394, 2015.
- GILL, S.S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 48, p. 909-930, 2010.
- GUERINOT, M. L. The ZIP family of metal transporters. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1465, p. 190-198, 2000.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. **Biochemical Journal**, v. 219, p. 1-14, 1984.

HIRAYAMA, T. et al. RESPONSIVE-TO-ANTAGONIST1, a Menkes/Wilson Disease-Related Copper Transporter, Is Required for Ethylene Signaling in *Arabidopsis*. **Cell**, v. 97, p. 383-393, 1999.

HUANG, X. Y. et al. A heavy metal P-type ATPase OsHMA4 prevents copper accumulation in rice grain. **Nature Communications**, v. 7, p. 1-13, 2016.

KABATA-PENDIAS, A. **Trace Elements in Soils and Plants**. 4^a ed. Florida: CRC Press, 2011. 534 p.

KAMPFENKEL, K. et al. Molecular Characterization of a Putative *Arabidopsis thaliana* Copper Transporter and Its Yeast Homologue. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 270, p. 28479-28486, 1995.

KÜPPER, H. et al. Copper-induced inhibition of photosynthesis: limiting steps of in vivo copper chlorophyll formation in *Scenedesmus quadricauda*. **Functional Plant Biology**, v. 30, p. 1187-1196, 2003.

LEE, S. et al. Rice P_{1B}-Type Heavy-Metal ATPase, OsHMA9, Is a Metal Efflux Protein. **Plant Physiology**, v. 145, p. 831-842, 2007.

LEE, S. et al. Activation of Rice *Yellow Stripe1-Like 16 (OsYSL16)* Enhances Iron Efficiency. **Molecules and Cells**, v. 33, p. 117-126, 2012.

LI, H. M. et al. Metalion-center assembly of ferredoxin and plastocyanin in isolated chloroplasts. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 87, p. 6748-6752, 1990.

LIU, Q. et al. Comprehensive Analysis of Rice Laccase Gene (*OsLAC*) Family and Ectopic Expression of *OsLAC10* Enhances Tolerance to Copper Stress in *Arabidopsis*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, p. 2-16, 2017.

LUO, Y. M. et al. Accumulation and chemical fractionation of Cu in a paddy soil irrigated with Cu-rich wastewater. **Geoderma**, v. 115, p. 113-120, 2003.

LUTSENKO, S. et al. Function and Regulation of Human Copper-Transporting ATPases. **Physiological Reviews**, v. 87, p. 1011-1046, 2007.

JIANG, L.Y.; YANG, X. E.; HE, Z. L. Growth response and phytoextraction of copper at different levels in soils by *Elsholtzia splendens*. **Chemosphere**, v. 55, p. 1179-1187, 2004.

MA, H. et al. The Phytocyanin Gene Family in Rice (*Oryza sativa* L.): Genome-Wide Identification, Classification and Transcriptional Analysis. **PLoS ONE**, v. 6, p. 1-15, 2011.

MARSCHNER H. **Mineral nutrition of higher plants**. 2^a ed. UK: Academic Press, 1995. 889 p.

- MARSCHNER, H. **Marschner's mineral nutrition of higher plants**. 3^a ed. New York: Academic Press, 2012. 651p.
- MAYER, A. M. Polyphenol oxidases in plants and fungi: Going places? A review. **Phytochemistry**, v. 67, p. 2318-2331, 2006.
- MEDDA, R.; PADIGLIA, A.; FLORIS, G. Plant Copper-Amine Oxidases. **Phytochemistry**, v. 39, p. 1-9, 1995.
- MIGOCKA, M. Copper-transporting ATPases: the evolutionarily conserved machineries for balancing copper in living systems. **International Union of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 67, p. 737-745, 2015.
- MIGOCKA, M. et al. Functional and Biochemical Characterization of Cucumber Genes Encoding Two Copper ATPases CsHMA5.1 and CsHMA5.2. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 290, p. 15717-15729, 2015.
- MILNER, M. J. et al. Transport properties of members of the ZIP family in plants and their role in Zn and Mn homeostasis. **Journal of Experimental Botany**, v. 64, p. 369-381, 2013.
- MOHAMMADI, M.; KAZEMI, H. Changes in peroxidase and polyphenol oxidase activities in susceptible and resistant wheat heads inoculated with *Fusarium graminearum* and induced resistance. **Plant Science**, v. 162, p. 491-498, 2002.
- MØLLER, J. V.; JUUL, B.; MAIRE, M. Structural organization, ion transport, and energy transduction of P-type ATPases. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1286, p. 1-51, 1996.
- OHKAWA, J. et al. Primary structure of cucumber (*Cucumis sativus*) ascorbate oxidase deduced from cDNA sequence: Homology with blue copper proteins and tissue-specific expression. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 86, p. 1239-1243, 1989.
- PALUMAA, P. et al. Metal-binding mechanism of Cox17, a copper chaperone for cytochrome *c* oxidase. **Biochemical Journal**. v. 382, p. 307-314, 2004.
- PÄTSIKKÄ, E. et al. Excess Copper Predisposes Photosystem II to Photoinhibition in Vivo by Outcompeting Iron and Causing Decrease in Leaf Chlorophyll. **Plant Physiology**, v. 129, p. 1359-1367, 2002.
- PEÑARRUBIA, L. et al. Temporal aspects of copper homeostasis and its crosstalk with hormones. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, p. 1-18, 2015.
- PEÑARRUBIA, L. et al. Regulation of copper transport in *Arabidopsis thaliana*: a biochemical oscillator? **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 15, p. 29-36, 2010.
- PEREA-GARCÍA, A. et al. Arabidopsis Copper Transport Protein COPT2 Participates in the Cross Talk between Iron Deficiency Responses and Low-Phosphate Signaling. **Plant Physiology**, v. 162, p. 180-194, 2013.

- PIGNOCCHI, C. et al. The Function of Ascorbate Oxidase in Tobacco. **Plant Physiology**, v. 132, p. 1631-1641, 2003.
- PILON, M. The copper microRNAs. **New Phytologist**, v. 213, p. 1030-1035, 2017.
- PILON-SMITS, E.; PILON, M. Phytoremediation of Metals Using Transgenic Plants. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 21, p. 439-456, 2002.
- PRINTZ, B. et al. Copper Trafficking in Plants and Its Implication on Cell Wall Dynamics. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, p. 1-16, 2016.
- PUIG, S. Function and regulation of the plant COPT family of high-affinity copper transport proteins. **Hindawi Publishing Corporation Advances in Botany**, v. 2014, p. 1-9, 2014.
- RAVET, K. et al. Spatiotemporal Analysis of Copper Homeostasis in *Populus trichocarpa* Reveals an Integrated Molecular Remodeling for a Preferential Allocation of Copper to Plastocyanin in the Chloroplasts of Developing Leaves. **Plant Physiology**, v. 157, p. 1300-1312, 2011.
- RAVET, K.; PILON, M. Copper and Iron Homeostasis in Plants: The Challenges of Oxidative Stress. **Antioxidants & Redox signaling**, v. 19, p. 919-932, 2013.
- RODRÍGUEZ, F. I. et al. A Copper Cofactor for the Ethylene Receptor ETR1 from *Arabidopsis*. **Science**, v. 283, p. 996-998, 1999.
- ROONEY, C. P.; ZHAO, F. J.; MCGRATH, S. P. Soil factors controlling the expression of copper toxicity to plants in a wide range of european soils. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 25, p. 726-732, 2006.
- RYAN, B. M. et al. Copper speciation and isotopic fractionation in plants: uptake and translocation mechanisms. **New Phytologist**, v. 199, p. 367-378, 2013.
- SANCENÓN, V. et al. Identification of a copper transporter family in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Molecular Biology**, v. 51, p. 577-587, 2003.
- SANCENÓN, V. et al. The Arabidopsis copper transporter COPT1 functions in root elongation and pollen development. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p. 15348-15355, 2004.
- SANTI, S.; SCHMIDT, W. Dissecting iron deficiency-induced proton extrusion in *Arabidopsis* roots. **New Phytologist**, v. 183, p. 1072-1084, 2009.
- SCHUBERT, M. et al. Proteome Map of the Chloroplast Lumen of *Arabidopsis thaliana*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 8354-8365, 2002.
- SHARMA, P. et al. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. **Hindawi Publishing Corporation Journal of Botany**, v. 2012, p. 1-26, 2012.
- SHIKANAI, T. et al. PAA1, a P-Type ATPase of Arabidopsis, functions in copper transport in chloroplasts. **The Plant Cell**, v. 15, p. 1333-1346, 2003.

SHIN, L. J.; LO, J. C.; YEH, K. C. Copper Chaperone Antioxidant Protein1 Is Essential for Copper Homeostasis. **Plant Physiology**, v. 159, p. 1099-1110, 2012.

SONG, Y. et al. Proteomic analysis of copper stress responses in the roots of two rice (*Oryza sativa* L.) varieties differing in Cu tolerance. **Plant Soil**, v. 366, p. 647-658, 2013.

SUDO, E. et al. Gene expression and sensitivity in response to copper stress in rice leaves. **Journal of Experimental Botany**, v. 59, p. 3465-3474, 2008.

SUNKAR, R.; KAPOOR, A.; ZHU, J. K. Posttranscriptional Induction of Two Cu/Zn Superoxide Dismutase Genes in *Arabidopsis* Is Mediated by Downregulation of miR398 and Important for Oxidative Stress Tolerance. **The Plant Cell**, v. 18, p. 2051-2065, 2006.

TAPKEN, W. et al. Regulation of Cu delivery to chloroplast proteins. **Plant Signaling & Behavior**, v. 10, p. 1-5, 2015.

TEWARI, R. K.; KUMAR, P.; SHARMA, P. N. Antioxidant responses to enhanced generation of superoxide anion radical and hydrogen peroxide in the copper-stressed mulberry plants. **Planta**, v. 223, p. 1145-1153, 2006.

THOUNAOJAM, T. C. et al. Excess copper induced oxidative stress and response of antioxidants in rice. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 53, p. 33-39, 2012.

TÓTH, G. et al. Heavy metals in agricultural soils of the European Union with implications for food safety. **Environment International**, v. 88, p. 299-309, 2016.

TURLAPATI, P. V. et al. The laccase multigene family in *Arabidopsis thaliana*: towards addressing the mystery of their gene function(s). **Planta**, v. 233, p. 439-470, 2011.

WANG, C. Y. et al. MiR397b regulates both lignin content and seed number in *Arabidopsis* via modulating a laccase involved in lignin biosynthesis. **Plant Biotechnology Journal**, v. 12, p. 1132-1142, 2014.

WILLIAMS, L. E.; MILLS, R. F. P_(1B)-ATPases: an ancient family of transition metal pumps with diverse functions in plants. **Trends in Plant Science**, v. 10, p. 491-502, 2005.

WINTZ, H. et al. Expression profiles of *Arabidopsis thaliana* in mineral deficiencies reveal novel transporters involved in metal homeostasis. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, p. 47644-47653, 2003.

YAMASAKI, H. et al. Regulation of copper homeostasis by micro-RNA in *Arabidopsis*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 282, p. 16369-16378, 2007.

YAMASAKI, H. et al. *SQUAMOSA* promoter binding Protein-Like 7 is a central regulator for copper homeostasis in *Arabidopsis*. **Plant Cell**, v. 21, p. 347-361, 2009.

YAMASAKI, H.; PILON, M.; SHIKANAI, T. How do plants respond to copper deficiency? **Plant Signaling & Behavior**, v. 3, p. 231-232, 2008.

- YAN, J. et al. Arabidopsis Pollen Fertility Requires the Transcription Factors CITF1 and SPL7 That Regulate Copper Delivery to Anthers and Jasmonic Acid Synthesis. **The Plant Cell**, v. 29, p. 3012-3029, 2017.
- YEN, M. R.; TSENG Y. H.; SAIER M. H. Maize *Yellow Stripe1*, an iron phytosiderophore uptake transporter, is a member of the oligopeptide transporter (OPT) family. **Microbiology**, v. 147, p. 2881-2883, 2001.
- YRUELA, I. Copper in plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 171, p. 145-156, 2005.
- YRUELA, I. Copper in plants: acquisition, transport and interactions. **Functional Plant Biology**, v. 36, p. 409-430, 2009.
- YRUELA, I. Transition metals in plant photosynthesis. **Metallomics**, v. 5, p. 1090-1109, 2013.
- YUAN, M. et al. The Bacterial Pathogen *Xanthomonas oryzae* Overcomes Rice Defenses by Regulating Host Copper Redistribution. **Plant Cell**, v. 9, p. 3164-3176, 2010.
- YUAN, M. et al. Molecular and functional analyses of COPT/Ctr-type copper transporter-like gene family in rice. **BMC Plant Biology**, v. 11, p. 1-12, 2011.
- XU, J. et al. Toxicity of copper on rice growth and accumulation of copper in rice grain in copper contaminated soil. **Chemosphere**, v. 62, p. 602-607, 2006.
- ZHANG, H.; LI, L. *SQUAMOSA* promoter binding protein-like7 regulated microRNA408 is required for vegetative development in *Arabidopsis*. **The Plant Journal**, v. 74, p. 98-109, 2013.
- ZHANG, Y. C. et al. Overexpression of microRNA OsmiR397 improves rice yield by increasing grain size and promoting panicle branching. **Nature biotechnology**, v. 31, p. 849-854, 2013.
- ZHAO, Q. et al. *LACCASE* Is Necessary and Nonredundant with *PEROXIDASE* for Lignin Polymerization during Vascular Development in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, v. 25, p. 3976-3987, 2013.
- ZHAO, Y. et al. MicroRNA857 Is Involved in the Regulation of Secondary Growth of Vascular Tissues in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v. 169, p. 2539-2552, 2015.
- ZHENG, L. et al. YSL16 Is a Phloem-Localized Transporter of the Copper-Nicotianamine Complex That Is Responsible for Copper Distribution in Rice. **The Plant Cell**, v. 24, p. 3767-3782, 2012.
- ZHOU, X. T. et al. Ectopic expression of SsPETE2, a plastocyanin from *Suaeda salsa*, improves plant tolerance to oxidative stress. **Plant Science**, v. 268, p. 1-10, 2018.