

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROBIOLOGIA

**Caracterização fisiológica e molecular de plantas de arroz mutantes para o
transportador de zinco OsZIP7**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Rafael Gonçalves Gindri

Santa Maria, RS, Brasil

2019

Caracterização fisiológica e molecular de plantas de arroz mutantes para o transportador de zinco OsZIP7

Rafael Gonçalves Gindri

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Agrobiologia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção de grau de **Mestre em Agrobiologia**

Orientador: Felipe Klein Ricachenevsky

Santa Maria, RS, Brasil

Gindri, Rafael

Caracterização fisiológica e molecular de plantas de arroz mutantes para o transportador de zinco OsZIP7 / Rafael Gindri.- 2019.

47 p.; 30 cm

Orientador: Felipe Klein Ricachenevsky

Coorientadores: Paloma Koprovski Menguer, Fernando Teixeira Nicoloso

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de Pós-Graduação em Agrobiologia, RS, 2019

1. Oryza sativa 2. Transportador 3. Zinco 4. Mutante
I. Klein Ricachenevsky, Felipe II. Koprovski Menguer,
Paloma III. Teixeira Nicoloso, Fernando IV. Título.

Rafael Gonçalves Gindri

**Caracterização fisiológica e molecular de plantas de arroz mutantes
para o transportador de zinco OsZIP7**

Dissertação apresentada ao curso de Pós
Graduação em Agrobiologia, da
Universidade Federal de Santa Maria
(UFSM, RS), como parte das exigências
para a obtenção do título de **Mestre em
Agrobiologia**.

Aprovado em 13 de Março de 2019:



Prof. Dr. Felipe Klein Ricachenevsky (UFSM)
(Presidente/Orientador)



Prof. Dr. Luciane Almeri Tabaldi (UFSM)



Prof. Dr. Raul Antonio Sperotto (UNIVATES)

Santa Maria, RS
2019

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho aos meus pais Valcir e Fátima, ao meu irmão Ricardo que sempre me incentivaram e estiveram ao meu lado durante toda essa trajetória.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, pela oportunidade de viver e aprender constantemente, por todas as graças alcançadas e também por cada dificuldade que me tornou mais forte, só assim pude conhecer o gosto que tem uma conquista.

À minha família, em especial aos meus pais, Valcir e Fátima, e meu irmão Ricardo que são meus alicerces e inspiração. Obrigado por me apoiarem quando nem tudo foi como esperava, por vibrarem comigo a cada vitória e por torcerem por mim sempre.

Ao professor orientador Felipe, por ter me ensinado, compartilhado comigo seu conhecimento e por ter me conduzido por esse caminho que me trouxe até aqui.

Aos meus amigos e colegas de laboratório, Luiz Henrique, Pedro, Fábio, Henrique, Milena, Lucas, Bruno e Rafaela, que me acolheram muito bem, e sempre compartilhando seus conhecimentos. Essa conquista não seria a mesma sem a ajuda de vocês.

Aos meus amigos e colegas do laboratório FísioPlant, em especial a Camila Tarouco que sempre me auxiliou em inúmeras análises. Obrigado!

Aos amigos Raíssa e Lincon, que sempre tiveram prontos para me auxiliar no que fosse necessário. Há vocês meu muito obrigado por tudo!!!

À UFSM pela oportunidade de realizar o curso de Pós de Graduação.

À CAPES pelo incentivo financeiro que tornou o trabalho possível.

Enfim, a todos que de uma forma ou de outra auxiliaram nesse processo e na elaboração da dissertação!

EPIGRAFE

O que torna um sonho irrealizável é a inércia de quem sonha!!

RESUMO

CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA E MOLECULAR DE PLANTAS DE ARROZ MUTANTES PARA O TRANSPORTADOR DE ZINCO OsZIP7

AUTOR: Rafael Gonçalves Gindri
ORIENTADOR: Felipe Klein Ricachenevsky

O arroz é uma das culturas mais importantes no mundo, sendo alimento diário para cerca de metade da população mundial. No entanto, o grão de arroz é pobre em micronutrientes como Fe e Zn, os dois minerais mais comumente deficientes na dieta humana. Em plantas, tanto Fe quanto Zn devem ser absorvidos do solo, distribuídos e armazenados na planta, de forma que suas concentrações sejam mantidas em níveis suficientes, porém, não tóxicos. A compreensão dos mecanismos e proteínas envolvidas na manutenção da homeostase de Fe e Zn em plantas tem o potencial de beneficiar a agricultura, melhorando o uso dos micronutrientes pelas plantas, assim como indicar abordagens que visam a biofortificação dos grãos, aumentando a qualidade nutricional dos mesmos. Dessa forma, este trabalho tem como objetivo caracterizar o mutante *oszip7* e o papel do transportador OsZIP7 no transporte de Zn em plantas de arroz. O estudo foi desenvolvido no Laboratório de Fisiologia de Plantas de Interesse Agrobiológico da Universidade Federal de Santa Maria. Plantas de arroz da linhagem mutante *oszip7* e do respectivo tipo selvagem (cv. Nipponbare), foram mantidas em sala de crescimento e em casa de vegetação, sob sistema hidropônico e submetidas a solução nutritiva: solução controle, excesso de Zn, deficiência de Zn. Após 24 dias de cultivo foram avaliados crescimento de parte aérea, crescimento e estrutura do sistema radicular, massa seca de raízes e de parte aérea, concentração de clorofila a/b e carotenoides, atividade das enzimas superóxido dismutase e peroxidase, as concentrações de peróxido de hidrogênio, expressão do gene OsZIP7 por RT-qPCR e quantificação de elementos como Zn por ICP-OES. Plantas do mutante *oszip7* quando cultivadas em deficiência de Zn, apresentaram um aumento no crescimento de área foliar, comprimento de raízes, diâmetros de raízes e área superficial. Quando analisado concentração de elementos nos tecidos de parte aérea, plantas do mutante apresentaram uma redução nas concentrações de Zn, quando cultivadas em solução controle, comparado com o tipo selvagem. A expressão do gene OsZIP7 em plantas do tipo selvagem foi maior quando submetido à deficiência de Zn. Quando as plantas foram submetidas a excesso de Zn a expressão do gene OsZIP7 foi reprimida em comparação com o tipo selvagem.

Palavras-chaves: Arroz, *Oryza sativa*, Transportador, Zinco, Mutante.

ABSTRACT

PHYSIOLOGICAL AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF MUTANT RICE PLANTS FOR THE OSZIP7 ZINC CONVEYOR

AUTHOR: Rafael Gonçalves Gindri
ADVISOR: Felipe Klein Ricachenevsky

Rice is one of the most important crops in the world, being daily food for about half of the world population. However, rice grain is poor in micronutrients such as Fe and Zn, the two most commonly deficient minerals in the human diet. In plants, both Fe and Zn must be absorbed from the soil, distributed and stored in the plant, so that their concentrations are maintained at sufficient but not toxic levels. The understanding of the mechanisms and proteins involved in the maintenance of Fe and Zn homeostasis in plants has the potential to benefit agriculture, improving the use of micronutrients by plants, as well as to indicate approaches that aim at biofortification of the grains, increasing their nutritional quality. Thus, this work aims to characterize the *oszip7* mutant and the role of the OsZIP7 transporter in Zn transport in rice plants. The study was developed in the Laboratory of Plant Physiology of Agrobiological Interest of the Federal University of Santa Maria. Rice plants of the *oszip7* mutant strain and the respective wild type (Nipponbare cv.) Were grown in a greenhouse under a hydroponic system and submitted to a nutrient solution: control solution, Zn excess, Zn deficiency and deficiency Fe. After 24 days of cultivation, shoot growth, root system growth and structure, root and shoot dry matter, chlorophyll fluorescence, chlorophyll a / b carotenoids concentration, SOD and POD enzyme activity were evaluated. concentrations of H₂O₂, expression of the OsZIP7 gene by RT-qPCR and quantification of elements such as Fe and Zn by ICP-OES. Plants of the *oszip7* mutant when cultivated in Zn deficiency showed an increase in leaf area growth, root length, root diameters and surface area, when analyzed for elemental concentration in the tissues of shoot plants of the mutant showed a reduction in the concentrations of Zn, when compared to the wild type. Expression of the OsZIP7 gene in wild-type plants was enhanced when subjected to Zn deficiency. When the plants were subjected to excess Zn, the expression of the OsZIP7 gene was suppressed in comparison with the wild type.

Key-words: Rice, *Oryza sativa*, Transporter, Zinc, Mutants.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Área foliar (a) e matéria seca de parte aérea (b) de plantas do tipo selvagem (cv. Nipponbare) e do mutante *oszip7* após 24 dias de tratamento.....34
- Figura 2- Comprimento de raízes (a), diâmetro médio de raízes (b), área superficial radicular (c) e massa seca de raízes (d) de plantas do tipo selvagem (cv. Nipponbare) e do mutante *oszip7* após 24 dias de tratamento.....34
- Figura 3 - Concentração de Zn (a), Fe (c), Cu (e) e Mn (g) em tecidos de parte aérea e de Zn (b), Fe (d), Cu (f) e Mn (h) em tecidos de raízes de plantas do tipo selvagem (cv. Nipponbare) e do mutante *oszip7* após 24 dias de tratamento.....35
- Figura 4- Clorofila *a* (a), clorofila *b* (b), clorofila total (c) e carotenoides (d) de plantas do tipo selvagem (cv. Nipponbare) e do mutante *oszip7* após 24 dias de tratamento.....37
- Figura 5- Taxa de assimilação líquida (a), condutância estomática (b), concentração de CO₂ intercelular (c), eficiência do uso da H₂O (d), eficiência da carboxilação da rubisco (e) e taxa de transpiração (f) em plantas do tipo selvagem (cv. Nipponbare) e do mutante *oszip7* após 24 dias de tratamento.....38
- Figura 6 - Concentração de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em raízes (a) e em folhas (b) plantas do tipo selvagem (cv. Nipponbare) e do mutante *oszip7* após 24 dias de tratamento.....39
- Figura 7- Atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) em raízes (a) e em folhas (b), de plantas do tipo selvagem (cv. Nipponbare) e do mutante *oszip7* após 24 dias de tratamento.....40
- Figura 8- Atividade das enzimas peroxidase (POD) em folhas (a) e em raízes (b) de plantas do tipo selvagem (cv. Nipponbare) e do mutante *oszip7* após 24 dias de tratamento.....41
- Figura 9- Expressão do gene *oszip7* em raízes de plantas do tipo selvagem (cv. Nipponbare) aos 24 dias de tratamento.....41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

At	<i>Arabidopsis thaliana</i>
cDNA	DNA complementar
Cu	Cobre
cv.	Cultivar
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ETR	Taxa de transporte de elétrons
Fm	Fluorescência máxima
Fo	Fluorescência mínima
Fv/Fm	Rendimento quântico máximo do PSII
MF	Matéria fresca
MS	Matéria seca
PCR	Reação em cadeia da polimerase (<i>Polymerase chain reaction</i>)
POD	Peroxidase
RT-qPCR	PCR em tempo real quantitativo com transcrição reversa (<i>Real Time Quantitative PCR</i>)
RUBISCO	Ribulose-1,5-bifosfato carboxilase oxidase
SOD	Superóxido dismutase
ZIP	Proteína ZRT-IRT (<i>zinc-regulated transporter- iron-regulated transporter</i>)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL.....	13
2. OBJETIVOS.....	15
2.1 OBJETIVO GERAL	15
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
3 REFERENCIAL TEÓRICO.....	16
3.1 ARROZ.....	16
3.2 ZINCO.....	16
3.2.1 Zinco Na Nutrição Humana	18
3.3 BIOFORTIFICAÇÃO	18
3.4 FAMÍLIA ZIP: TRANSPORTADORES	19
REFERÊNCIAS.....	21
4. Manuscrito: Alterações fisiológicas e moleculares em um mutante de perda de função para o gene OsZIP7 de arroz (<i>Oryza sativa</i> L.).....	26
4.1 INTRODUÇÃO	27
4.2 MATERIAL E MÉTODOS	28
4.2.1 Material vegetal e condições de crescimento	28
4.2.2 Avaliações biométricas de raízes e área foliar	29
4.2.3 Produção de matéria seca	29
4.2.4 Determinação da concentração de peróxido de hidrogênio (H₂O₂)	29
4.2.5 Concentração de pigmentos fotossintéticos	30
4.2.6 Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD).....	30
4.2.7 Atividade da enzima peroxidase (POD)	31
4.2.8 Parâmetros fotossintéticos.....	31
4.2.9 Concentração de elementos minerais nos tecidos	32
4.2.10 Análises de expressão gênica por RT-qPCR	32
4.2.11 Análises estatística	33
4.3 RESULTADOS	33
4.3.1 Variáveis de crescimento e concentração de elementos minerais em plantas do tipo selvagem e do mutante <i>oszip7</i>	33
4.3.2 Pigmentos fotossintéticos	37
4.3.3 Parâmetros fotossintéticos.....	38
4.3.5 Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD).....	40
4.3.6 Atividade da enzima peroxidase (POD)	40
4.3.7 Análise da expressão gênica no tipo selvagem	41

4.4. DISCUSSÃO	42
4.5 CONCLUSÕES.....	44
5. REFERÊNCIAS	45
6. DISCUSSÃO GERAL	47

1 INTRODUÇÃO GERAL

O arroz (*Oryza sativa L.*) é uma cultura de grande importância na alimentação da população mundial. É cultivado em todos os continentes (exceto na Antártida), e tem na Ásia a maior parte da produção. No Brasil, a produção é de aproximadamente 13 milhões de toneladas anuais, o que faz do país o nono maior produtor mundial, sendo o maior produtor não-asiático (FAO, 2013). Dentre as regiões produtoras destaca-se o sul do país, com o estado do Rio Grande do Sul cultivando 8.750.774 toneladas do grão, sendo responsável por aproximadamente 61% de todo o arroz produzido no Brasil (IRGA, 2017).

No Brasil, o arroz faz parte da alimentação básica da população, constituindo-se em uma das principais fontes de calorias. Em decorrência disso, desempenha papel estratégico em questões de segurança alimentar (GAMEIRO et al., 2008). Em média, são consumidos 95 g pessoa⁻¹ dia⁻¹ no país, colocando o Brasil como o 55º maior consumidor (FAO, 2013). Apenas uma pequena parte do arroz é consumido como ingrediente em produtos processados. A maior parte do consumo ocorre na forma de grão. O grão de arroz apresenta baixas concentrações de nutrientes como ferro (Fe) e zinco (Zn), sendo o cereal com as concentrações mais baixas e que apresenta a variabilidade genética mais restrita para melhoramento convencional desta característica (KENNEDY e BURLINGAME, 2003; PFEIFFER et al., 2008). Estima-se que as deficiências de Fe e Zn em humanos afetam cerca de 30% da população mundial, sendo as duas principais deficiências minerais em humanos (HAMBIDGE, 2000). Dietas baseadas principalmente em cereais, comuns em países e populações pobres, aumentam os riscos de desnutrição, indicando que esforços para a melhoria da qualidade nutricional de grãos são necessários (GÓMEZ-GALERA et al., 2010).

O Zn é um nutriente que apresenta grande importância também para o desenvolvimento e funcionamento das plantas, está presente em diversos processos metabólicos fazendo parte da fotossíntese, síntese proteica, manutenção da integridade da membrana, reprodução e expressão gênica. No organismo humano esse nutriente também desempenha importantes funções, participa de processos de diferenciação celular, crescimento, desenvolvimento neurológico e funcionamento do sistema imunológico, e faz parte de mais de 300 proteínas conhecidas (SINCLAIR e KRÄMER, 2012).

Várias estratégias vêm sendo desenvolvidas para diminuir a deficiência de micronutrientes. A suplementação ou fortificação de alimentos consiste na adição de nutrientes exógenos durante o processamento para aumentar o valor nutritivo dos alimentos. Por outro

lado, a biofortificação consiste na produção de alimentos com maior capacidade de acumular nutrientes nas suas partes comestíveis, com impacto benéfico para a população consumidora, sem a necessidade de intervenção humana durante o processamento (JEONG e GUERINOT, 2008).

A biofortificação pode ser realizada basicamente de duas formas: por meio da engenharia genética ou por meio da fertilização dos solos ou fertilização foliar. Embora venha se trabalhando bastante para entender como plantas de arroz regulam a absorção e distribuição de Zn, com algumas proteínas já caracterizadas como possíveis transportadores desse metal, a compreensão da homeostase de Zn, ainda é incompleta. Estudos já mostraram que alguns membros da família ZIP (*ZRT/IRT - Zinc-Regulated/ Iron-Regulated Transporter*) são capazes de transportar Zn, tanto em leguminosas, como soja, quanto em gramíneas, como arroz (MOREAU et al., 2002; RAMESH et al., 2003). Ainda assim, vários membros da família não foram caracterizados. Portanto, este trabalho visa caracterizar um transportador de Zn em arroz, denominado OsZIP7.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar uma linhagem mutante de arroz que não expressa a proteína OsZIP7, com o intuito de compreender a função de OsZIP7 na homeostase de Zn em plantas de arroz.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar o crescimento da parte aérea de plantas de arroz do tipo selvagem e mutante *oszip7* sob condições controle, deficiência de Zn e excesso de Zn.
2. Avaliar a morfologia do sistema radicular de plantas de arroz do tipo selvagem e mutante *oszip7* sob condições controle, deficiência de Zn e excesso de Zn.
3. Determinar o acúmulo de peróxido de hidrogênio em raízes e folhas de plantas de arroz do tipo selvagem e mutante *oszip7* sob condições controle, deficiência de Zn e excesso de Zn.
4. Determinar a expressão do gene *OsZIP7* em folhas e raízes de plantas de arroz do tipo selvagem sob condições controle, deficiência de Zn e excesso de Zn.
5. Avaliar a concentração do elemento Zn e de outros nutrientes e elementos-traço em plantas de arroz do tipo selvagem e mutante *oszip7* sob condições controle, deficiência de Zn e excesso de Zn.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 ARROZ

O arroz (*Oryza sativa* L.) é uma planta de ciclo anual pertencente à classe Monocotiledônea, família Poaceae. Seu fruto é classificado como grão ou cariopse. É alimento básico para mais da metade da população mundial, sendo assim um dos cereais mais consumidos no mundo, juntamente com o milho e o trigo (SASAKI e BURR, 2000). Atualmente, o arroz é o segundo cereal mais cultivado no mundo, ocupando uma área de aproximadamente 148 milhões de hectares, sendo os principais produtores os países asiáticos. O Brasil está entre os dez principais produtores mundiais, com uma produção de aproximadamente 13 milhões de toneladas por ano, sendo considerado o maior produtor não-asiático (FAO, 2009). Entre os estados brasileiros, o Rio Grande do Sul se destaca como o maior produtor nacional, sendo responsável por aproximadamente 61% do total do arroz produzido no Brasil, com uma área de aproximadamente 1.106.527 hectares (IRGA, 2017). O arroz é a base da economia de 131 municípios gaúchos, a maior parte deles localizados na metade sul do estado (IBGE, 2016).

Além da importância econômica, o arroz possui importância científica pelo fato de possuir o menor genoma entre as plantas cultivadas, entre 398 a 466 Mb na região eucromática, o que torna o arroz uma planta modelo para estudos em monocotiledôneas (GOFF et al., 2002; YU et al., 2002; IRGSP, 2005). Apresenta diferentes subespécies, como a *indica* e *japonica*, que já possuem o seu genoma completamente sequenciado, além de ter diversos recursos disponíveis que auxiliam o estudo e entendimento dessa planta, sendo eles bibliotecas de mutantes por inserção de T-DNA, bancos contendo cerca de 40.000 cDNAs completos, ferramentas para análise de expressão e co-expressão de transcritos, bases de dados proteômica, etc. (YU et al., 2002).

3.2 ZINCO

O zinco (Zn) é um elemento essencial para todos os organismos. É o segundo metal de transição mais abundante em organismos vivos, e está envolvido em diversos processos bioquímicos como o metabolismo de proteínas, carboidratos, lipídios, RNA e DNA, sendo um componente estrutural essencial de 300 enzimas e 2000 fatores de transcrição (GROTZ e GUERINOT, 2006; BROADLEY et al., 2011; PRASAD, 2012). É importante para o

funcionamento de diversos processos metabólicos nas plantas tais como fotossíntese, formação de sacarose e amido, síntese proteica, manutenção da integridade da membrana, metabolismo de auxina e reprodução (MARSCHNER, 1995; BARKER, 2007). Uma das funções mais conhecidas do Zn está relacionada com a regulação da expressão gênica. A maior classe de proteínas ligantes de Zn é das que contêm domínios do tipo dedos de zinco, e são dependentes do metal para reconhecer sequências de DNA específicas e ativar a transcrição gênica (ALBERTS et al., 1998; BROWN, 2006).

O Zn apresenta alta afinidade por uma ampla variedade de ligantes e pode adotar diversas geometrias em coordenação com outros átomos, sendo por isso extremamente flexível. Em condições biológicas, seu estado redox (+2) não é alterado e, portanto, o Zn não participa de reações de transferência de elétrons. Por isso, em comparação com outros metais de transição como Fe e Cu, o uso de Zn em macromoléculas é considerado mais seguro (SINCLAIR e KRÄMER, 2012).

As plantas absorvem o Zn na forma de cátion divalente (Zn^{+2}) e, em condições de pH alto, também na forma de cátion monovalente ($ZnOH^+$) (MARSCHNER, 1995). A disponibilidade de Zn na solução do solo depende das características do mesmo: solos arenosos possuem baixos níveis de Zn, e solos calcários apresentam baixa disponibilidade desse metal (ALLOWAY, 2004). Quando a disponibilidade de Zn para as plantas é inferior ao que necessitam para seu desenvolvimento, o que significa concentrações na parte aérea mais baixas que $15-20 \mu g g^{-1}$ de peso seco, as plantas estão sob deficiência de Zn (MARSCHNER, 1995; SINCLAIR e KRÄMER, 2012). A deficiência de Zn provoca diversas mudanças no metabolismo das plantas, sendo a redução de biomassa, maior ramificação da parte aérea, baixa fertilidade floral e início prematuro da senescência os principais sintomas visíveis. Várias mudanças bioquímicas também podem ser relacionadas à deficiência de Zn: redução da atividade fotossintética, produção de radicais livres, diminuição da síntese proteica, redução dos níveis de auxinas, entre outras (MARSCHNER, 1995). A cultura do arroz irrigado, onde os solos permanecem longos períodos inundados, acaba gerando condições redutoras, podendo ocasionar uma redução de pH e o aumento das concentrações de íons bicarbonato, acarretando na inibição da absorção de Zn pelas plantas (MARSCHNER, 1995). Já o excesso de Zn nas plantas acarreta prejuízos no desenvolvimento, apresentando sintomas de inibição do alongamento radicular e clorose nas folhas jovens (MARSCHNER, 1995).

3.2.1 Zinco Na Nutrição Humana

O Zn é considerado um elemento de ampla distribuição no corpo humano, sendo necessário para a atividade de mais de 300 enzimas envolvidas na manutenção de importantes vias metabólicas do organismo. Dentre as funções desempenhadas pelo Zn, destaca-se a sua participação nos processos de diferenciação celular, crescimento, desenvolvimento neurológico e funcionamento do sistema imunológico, defesa antioxidante, crescimento e desenvolvimento (SINCLAIR e KRÄMER, 2012; SZCKUREK et al., 2001). O Zn entra no organismo humano através da ingestão de alimentos, sendo que as principais fontes alimentares são carnes bovinas, peixes, aves, leite, queijos, cereais, entre outros (DOMENE et al., 2008).

De acordo com uma estimativa da Organização Mundial da Saúde (OMS) cerca de 31% da população mundial apresenta deficiência nutricional de Zn, afetando igualmente grupos populacionais em países desenvolvidos e em desenvolvimento, principalmente crianças e idosos (BLACK et al., 2008). A deficiência de Zn pode ser caracterizada como um problema de saúde pública, por estar associada ao aumento da mortalidade, aumento da morbidade e gravidade das enfermidades infecciosas, déficit de crescimento, alterações fisiológicas e comprometimento da capacidade cognitiva (PEDRAZA e SALAS, 2015). Em geral, a deficiência de Zn é particularmente comum em regiões do mundo onde a população se baseia principalmente em dietas de cereais, que geralmente apresentam baixa disponibilidade de Zn para o organismo (GÓMEZ-GALERA et al., 2010).

3.3 BIOFORTIFICAÇÃO

Nos dias de hoje, tem-se buscado diversas maneiras que possam auxiliar no melhoramento dos teores de micronutrientes na alimentação humana, sendo que a biofortificação vem se tornando uma alternativa viável nesse processo (MORAES et al., 2012). A biofortificação é definida como o aumento das concentrações biodisponíveis de nutrientes nas partes comestíveis de plantas (WHITE e BROADLEY, 2005). A biofortificação pode ser realizada basicamente de duas formas: biofortificação agrônômica, por meio da fertilização dos solos e fertilização foliar; e por meio do melhoramento de plantas, o que pode ser feito por técnicas clássicas de melhoramento por cruzamentos e mutagênese, ou por transgenia e edição de genomas. Hoje já existem diversos programas de pesquisas dedicados à biofortificação, principalmente em cereais como o milho, trigo, feijão e arroz (HUSSAIN et al., 2012).

Hoje já se encontram pesquisas utilizando a técnica da biofortificação com o objetivo de aumentar as concentrações de Fe e Zn em plantas de arroz (WIRTH et al., 2009; SPEROTTO et al., 2009; SPEROTTO et al., 2010). No entanto, tentativas de realizar biofortificação em arroz para aumentar as concentrações de Zn e Fe enfrentam algumas dificuldades, pois mostraram-se pouco efetivas, principalmente devido à baixa variabilidade nas concentrações de Fe e Zn no germoplasma de arroz, diferente do que se observa em trigo e milho (KENNEDY e BURLINGAME, 2003; PFEIFFER et al., 2008). Desse modo, a biofortificação de alimentos surge como uma importante ferramenta para combater as deficiências de micronutrientes em partes comestíveis das plantas, trazendo inúmeros benefícios para a saúde de população mundial. No entanto, para isso ainda é necessária uma melhor compreensão sobre os mecanismos e genes envolvidos na absorção e transporte de micronutrientes em plantas de arroz (MORAES et al., 2012).

3.4 FAMÍLIA ZIP: TRANSPORTADORES

A família ZIP (*ZRT/IRT - Zinc-Regulated/ Iron-Regulated Transporter*) leva esse nome devido aos primeiros membros a serem identificados, o IRT1 em *Arabidopsis thaliana* e ZRT1 e ZRT2 em leveduras. Estudos já demonstraram que os membros dessa família são normalmente transportadores de membrana, desempenhando função no transporte de micronutrientes como Fe, Zn, Mn e Cu, além do transporte de metais pesados como o Cd (GUERINOT, 2000; MILNER et al., 2013). Encontram-se hoje mais de 25 membros pertencentes à família ZIP, estando presentes em plantas (*Arabidopsis*, tomate, ervilha e arroz), bem como também em humanos (GUERINOT, 2000).

O primeiro transportador da família ZIP descrito foi AtIRT1, caracterizado em *A. thaliana* como um transportador de Fe. Em seguida, ZRT1 e ZRT2 foram caracterizados como transportadores de Zn em leveduras (EIDE et al., 1996; ZHAO e EIDE, 1996). As proteínas ZIPs podem ser cruciais na adaptação das plantas à baixa disponibilidade de Zn no solo, sendo que vários membros da família ZIP vem sendo caracterizados como responsivos à deficiência de Zn em várias espécies de plantas (GROTZ et al., 1998; ISHIMARU et al., 2005; CHEN et al., 2008; LEE et al., 2010; LI et al., 2013).

Diversos membros da família ZIP, quando estudados em diferentes espécies, foram descritos como possíveis transportadores de Zn. AtZIP1, AtZIP2 e AtZIP3 apresentaram capacidade de transportar Zn em leveduras (GROTZ et al., 1998). Em estudos com espécies de leguminosas, outras proteínas foram descritas como transportadoras de Zn, sendo que GmZIP1

foi o primeiro transportador da família ZIP descrito em soja (*Glycine max*), atuando como um transportador de Zn específico de nódulos (MOREAU et al., 2002). Já em *Medicago truncatula*, também pertencente à família das leguminosas, as proteínas MtZIP1, MtZIP5 e MtZIP6 foram caracterizadas como transportadores de Zn (LÓPEZ-MILLÁN et al., 2004).

Em espécies de gramíneas, principalmente em plantas de arroz, diversas proteínas da família ZIP tem sido estudadas e caracterizadas como transportadores de Zn. O gene OsZIP8 em plantas de arroz é induzido em raízes ou folhas em deficiência de Zn. Entretanto, a expressão de OsZIP8 não foi induzida em raízes ou folhas quando as plantas foram colocadas em deficiência de Fe (YANG et al., 2009). Em plantas de cevada cultivadas sob deficiência de Zn a expressão dos genes HvZIP3, HvZIP5, HvZIP7, HvZIP8, HvZIP10 e HvZIP13 foi induzida nas raízes, promovendo uma maior capacidade de captação e translocação de Zn da raiz para a parte aérea em plantas sob deficiência de Zn (TIONG et al., 2015). Da mesma forma, os genes OsZIP1, OsZIP3, OsZIP4, OsZIP5 e OsZIP8 foram caracterizados como transportadores de Zn quando expressos em leveduras (RAMESH et al., 2003; ISHIMARU et al., 2005; ISHIMARU et al., 2007; LEE et al., 2010; YANG et al., 2009).

Entre os diversos membros de transportadores da família ZIP, o transportador OsZIP7 vem sendo estudado pelo nosso grupo de pesquisa, sendo que resultados já mostraram que esse transportador está localizado na membrana plasmática, tendo a capacidade de transportar Zn, tanto quando expresso em leveduras como em *A. thaliana*. Em Arabidopsis, a expressão constitutiva de OsZIP7 causa alteração na sensibilidade ao excesso de Zn e no acúmulo de Zn nas folhas e sementes. Também foi observado que OsZIP7 não atua como um transportador de Fe e Cd quando expresso em levedura. Nesse mesmo estudo quando o OsZIP7 foi expresso em *A. thaliana*, os resultados mostraram aumento nas concentrações de Zn em sementes, bem como uma diminuição das concentrações de Cd, o que faz desse gene um bom candidato para biofortificação (RICACHENEVSKY et al., 2018),

OsZIP7 é o ortólogo de arroz dos genes de cevada, HvZIP7, de milho, ZmZIP7; e de Arabidopsis, AtIRT3, AtZIP4 e AtZIP9. HvZIP7 foi caracterizado como um transportador de Zn também localizado na membrana plasmática, e que foi altamente induzido em raízes e folhas de plantas sob deficiência de Zn (TIONG et al., 2014). O ZmZIP7 transportador presente em milho foi caracterizado como um transportador de membrana plasmática, com alta expressão em folhas, caule, raízes e sementes (LI, et al., 2016). Em estudos realizados expressando ZmZIP7 de maneira constitutiva em plantas de Arabidopsis, os resultados sugerem que o gene está envolvido na absorção e no transporte de Zn e Fe para a parte aérea, bem como no transporte de Fe para as sementes. Entretanto, os resultados obtidos nesse estudo também

sugerem que plantas expressando ZmZIP7 podem tolerar o excesso de Zn e Fe. Assim, fica claro que ZmZIP7 é um transportador funcional de Zn e Fe (LI, et al., 2016).

REFERÊNCIAS

ALBERTS, I.L.; NADASSY, K. Analysis of zinc binding sites in protein Crystal structures. **Protein Science**, v.7, n.1, p.1700-1716, Apr. 1998.

ALLOWAY, B. J. **Zinc in soils and crop nutrition**. 2. ed. Brussels: IFA, 115p. 2004.

BEARKAR, A. V.; PILBEAN, D. J. **Handbook of Plant Nutrition**, 2. ed. New York: CRC, 613 p. 2007.

BLACK, R. E.; ALEN, L. H.; BHUTTA, Z. A.; CAULFIELD, L. E.; DE ONIS, M.; RIVERA, J. Maternal and child undernutrition: global and regional exposures and health consequences. **The Lancet**, v. 371, n. 9608, p. 243-260, Jan. 2008.

BROADLEY, M. R.; WHITE, P. J.; HAMMOND, J. P.; ZELKO, I.; LUX, A. Zinc in plants. **New phytologist**, v.173, n. 2, p. 677-702, Dec. 2007.

BROWN, T.A. **Genomes**, 3. ed. Manchester: Garland Science, 600p. 2006

CHEN, W.; FENG, Y.; CHAO, Y. Genomic analysis and expression pattern of OsZIP1, OsZIP3, and OsZIP4 in two rice (*Oryza sativa L.*) genotypes with different zinc efficiency. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 55, n. 3, p. 400-409, May. 2008.

COLANGELO, E. P.; GUERINOT, M. L. Put the metal to the petal: metal uptake and transport throughout plants. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 9, n. 3, p. 322-330, Jun. 2006.

COUNCE, P.; KEISLING, T. C.; MITCHELL, A. J. A. Uniform, objective, and adaptive system for expressing rice development. **Crop Science**, v. 40, n. 2, p. 436-443, Feb. 2000.

DAMENE, A.M.; PEREIRA, C.T.; ARRIVILLAGA, K.R. Estimated zinc availability in school meals done with standard foods in the city of Campinas (SP), **Brazil Rev. Natur**, v. 2, n. 10, p. 161-167, Mar. 2008.

EIDE, D.; BRODERIUS, M.; FETT, J. P.; GUERINOT, M. A novel iron-regulated metal transporter from plants identified by functional expression in yeast. **Proc Nat Sci**, v. 93, n. 11, p. 5624-5628, May. 1996.

EMBRAPA-Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – CNPS: Manual de métodos de análise de solos. 1997. Embrapa Solos, Rio de Janeiro, 212p.

FAO – FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Rice market monitor trade and markets division**. 2013. Available from: <<http://www.fao.org/economic/est/publications/rice-publications/rice-market-monitor-rmm/en/>>. Acesso em: 10/07/2017.

GAMEIRO, H. G.; GAMEIRO, P. M. B. O Consumo de arroz no Brasil. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, v.46, n. 4, p. 1043-1066, out/ dez. 2008.

GUERINOT, M.L. The ZIP family of metal transporters. **Biochimica et Biophysica Acta** **1465**, v. 1465, n. 10, p. 190-198, May. 2000.

GOFF, S. A. et al. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. japonica). **Science**, v.296, n. 20, p. 92-100, Jun. 2002.

GÓMEZ-GALERA, E. T. S.; ROJAS, E.; SUDHAKA, D.; ZHU, C.; PELACHO, A. M.; CAPELL, T.; CHRISTOU, P. Critical evaluation of strategies for mineral fortification of staple food crops. **Transgenic Res**, v. 19, p.165-80, Apr. 2010.

GROTZ, N.; GUERINOT, M. L. Molecular aspects of Cu, Fe and Zn homeostasis in plants. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1763, n. 7, p. 595-608, Jul. 2006.

GROTZ, N.; FOX, T.; CONNOLLY, E.; PARK, W.; GUERINOT, M. L.; EIDE, D. Identification of a family of zinc transporter genes from Arabidopsis that respond to zinc deficiency. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 12, p. 7220-7224, Jun. 1998.

HAMBIDGE, M. Human zinc deficiency. **Journal of nutrition**, v. 130, n. 5, p. 13445-13449, May. 2000.

HUSSAIN, S.; MUHAMMAD, A. M.; ZED, R.; TARIQ, A. Biofortification and estimated human bioavailability of zinc in wheat grains as influenced by methods of zinc application. **Plant and Soil**, v. 361, n. 10, p. 279-290, Dec. 2012.

IBGE. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. Disponível em: www.ibge.gov.br > acesso em 12/11/2016

IRGA. **Instituto Riograndense do Arroz**. Disponível em: www.irga.rs.gov.br> acesso em: 23/08/2017

IRGSP - International Rice Genome Sequencing Project. The map-based sequence of the rice genome. **Nature**, v. 436, p. 793-800, Dec. 2005.

ISHAMURU, Y.; MASUDA, H.; SUZUKI, M.; BASHIR, K.; TAKAHASHI, M. Overexpression of the OsZIP4 zinc transporter confers disarrangement of zinc distribution in rice plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, n. 11, p. 2909-2915, Jul. 2007.

ISHIMARU, Y.; SUZUKI, M.; KOBAYASHI, T.; TAKAHASHI, M.; NAKANISHI, H. OsZIP4, a novel zinc-regulated zinc transporter in rice. **Journal of Experimental Botany**, v. 56, n. 13, p. 3207-3214, Dec. 2005.

ISHIMARU, Y.; KIM, S.; TSUKAMOTO, T.; OKI, H.; KOBAYASHI, T.; WATANABE, S.; MATSUHASHI, S. Mutational reconstructed ferric chelate reductase confers enhanced tolerance in rice to iron deficiency in calcareous soil. **Proc Natl Acad Sci**, v. 104, n. 18, p. 7373-7378, May. 2007.

JEONG, J.; GUERINOT, M. L. Biofortified and bioavailable: The gold standard for plant diets. **Panas**, v. 105, n. 6, p. 1777-1778, Feb. 2008.

KENNEDY, G.; BURLINGAME, B. Analysis of food composition data on rice from a plant genetic resources perspective. **Food Chemistry**, v. 80, n. 4, p. 589-596, Apr. 2003.

KIM, J. et al. Construction of gene-specific primers for various antioxidant isoenzyme genes and their expressions in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings obtained from gamma-irradiated seeds. **Journal of Photoscience**, v. 11, n. 3, p. 115-120, Dec. 2004.

KORSHUNOVA, Y. O.; EIDE, D.; CLARK, G.; GUERINOT, M. L.; PAKRASI, B. The IRT1 protein from *Arabidopsis thaliana* is a metal transporter with a broad substrate range. **Plant Mol Biol**, v. 40, p. 37-44, May. 1999.

LEE, S.; KIM, S. A.; LEE, J.; GUERINOT, M. L. Zinc deficiency-inducible OsZIP8 encodes a plasma membrane-localized zinc transporter in rice. **Mol Cells**, v. 29, n.18, p. 551-558, Jun. 2010.

LICHTENTH, H. K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. **Method Enzymol**, v. 148, n.20, p. 350-382, 1987.

LI, S.; ZHOU, X.; ZHAO, Y.; LI, H.; LIU, Y.; ZHU, L. Constitutive expression of the ZmZIP7 in *Arabidopsis* alters metal homeostasis and increases Fe and Zn content. **Plant Physiol**, v.106, p. 1-10, July. 2016.

LI, S.; ZHOU, X.; HUANG, Y.; ZHU, L.; ZHANG, S. Identification and characterization of the zinc-regulated transporters, iron-regulated transporter-like protein (ZIP) gene family in maize. **BMC Plant Biology**, v. 13, n. 144, p. 03-14, Aug. 2013.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the 2-Ct method. **Methods**, v. 25, n. 2, p. 402-408, Dec.2001.

LÓPEZ-MILLÁN, A. F.; ELLIS, D. R.; GRUSAK, M. A. Identification and characterization of several new members of the ZIP family of metal ion transporters in *Medicago truncatula*. **Plant Mol Biol**, v. 54, n. 4, p. 583-96, Mar. 2004.

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, n. 4 p. 1781-1787, Dec. 2001.

MILNER, M. J.; SEAMON, J.; CRAFT, E.; KOACHIAN, L. V. Transport properties of members of the ZIP family in plants and their role in Zn and Mn homeostasis. **Journal of Experimental Botan**, v. 64, n.1, p.369-381, Jan. 2013.

MORAES, M. F.; PASCOALINO, J. A. L.; ALVES, S. J. F.; NUTTI, M. R. CARVALHO, J. L. V. Biofortificação alternativa à segurança nutricional. **Informações Agronômicas**, Piracicaba, n. 140, p. 09-15, dez. 2012.

MOREAU, S.; THOMSON, R. M.; KAISER, B. N.; TREVASKI, B.; GUERINOT, M. L.; UDVARD, M. K.; PUPPO, A.; DAY, D. A. GmZIP1 encodes a symbiosis-specific zinc transporter in soybean. **J Biol Chem**, v. 277, n. 7, p. 4738-4746, Feb. 2002.

PFEIFFER, W. H, McCLAFFER, B. Biofortification: breeding micronutrient- dense crops. *Breeding Major Food Staples: Blackwell Publishing Ltd.* v.1, n. 1, p. 61-91, Apr. 2008.

PRASAD, A., S. Discovery of human zinc deficiency: 50 years later. v. 26, n.7, p. 66-69, Jun. 2012.

RAMESH, S. A.; SHIN, R.; EIDE, D. J.; SCHACHTMAN, D. P. Differential metal selectivity and gene expression of two zinc transporters from rice. **Plant Physiology**, Washington, v. 133, n. 1, p. 126-134, Sept. 2003.

SINCLAIR, S. A., KRÄMER, U. The zinc homeostasis network of land plants. **Biochim Biophys Acta**, v. 1823, n.12, p. 1553-1567, Sept. 2012.

SPEROTTO, R.A.; RICACHENEVSKY, F.K.; DUARTE, G. L.; LOPES, K.L.; SPERB, E.R.; GRUSAK, M.A.; FETT, J.P. Identification of up-regulated genes in flag leaves during rice grainfilling and characterization of OsNAC5, a new ABA-dependent transcription factor. **Planta**, v. 230, p. 985-1002, Oct. 2009.

SPEROTTO, R.A.; DUARTE, G. L.; SANTOS, L.S.; GRUSAK, M.A.; FETT, J.P. Identification of putative target genes to manipulate Fe and Zn concentrations in rice grains. **Plant Physiol**, v. 167, p. 1500-1506, May. 2010.

SZCKUREK, E.I.; BJORNSSON, C.S.; TAYLOR, C.G. Dietary zinc deficiency and repletion modulate metallothionein immunolocalization and concentration in small intestine and liver of rats. **Rev. Natur**, v. 2, n. 10, p. 131-113, Jun. 2001.

TIECHER, T. L.; CERETA, A. C.; FERREIRA, A. A. C.; LOURENZI, R. C. The potential of *Zea mays* L. in remediating copper and zinc contaminated soils for grapevine production. **Geoderma**, v. 262, p. 52-61, May. 2016.

TIONG, J.; McDONALD, G.; GENC, Y.; SHIRLEY, N.; LANGREDGE, P.; HUANG, Y. Increase d expression of six ZIP family by zinc (Zn) deficiency is associated with enhanced up take and root-to-shoot translocation of Zn in balley (*Hordeum vulgare*). **New Phytologist**, v. 207, n. 1, p. 1097-1109, Jan. 2015.

TIONG, J.; McDONALD, G.K.; GENC Y.; PEDAS, P.; HAYES, J.E.; TOUBIA, J. HvZIP7 mediates zinc accumulation in barley (*Hordeum vulgare*) at moderately high zinc supply. **New Phytol**, v. 201, p. 134-143, July. 2014.

WHITE, P.J, BROADLEY, M.R. Biofortifying crops with essential mineral elements. **Trends Plant**, v. 10, n. 12, p. 586-593, Dec. 2005.

WIRTH, J.; POLETTI, S.; AESCHLIMANN, B.; YAKANDAWALA, N., OSORIO, S.; TOHGE, T.; FERNIE, A.R.; GUNTHER, D.; GRUISSEM, W.; SAUTTER, C. Rice endosperm iron biofortification by targeted and synergistic action of nicotianamine synthase and ferritin. **Plant Biotechnol.** v.7, p. 631-644, Mar. 2009.

YANG, X.; HUANG, J.; JIANG, Y.; ZHAN, G. H S. Cloning and functional identification of two members of the ZIP (Zrt, Irt-like protein) gene family in rice (*Oryza sativa* L.). **Mol Biol Rep.**, v. 36, p. 281-287, Sept. 2009.

YU, J. H. U.; WANG, J.; WONG, G. K. LI, S. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. *spp indica*). **Science**, v. 296, n. 2, p. 79-92, Apr. 2002.

ZHAO, H.; EIDE, D. The yeast ZRT1 gene encodes the zinc transporter protein of a high-affinity uptake system induced by zinc limitation. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v.93, p. 2454-2454, Mar. 1996.

4. Manuscrito: Alterações fisiológicas e moleculares em um mutante de perda de função para o gene OsZIP7 de arroz (*Oryza sativa* L.)

RESUMO

O arroz é uma das culturas mais importantes no mundo, sendo alimento diário para cerca de metade da população mundial. No entanto, o grão de arroz é pobre em micronutrientes como Fe e Zn, os dois minerais mais comumente deficientes na dieta humana. Em plantas o Zn é absorvido do solo, distribuídos e armazenado na planta, de forma que suas concentrações sejam mantidas em níveis suficientes, porém, não tóxicos. A compreensão dos mecanismos e proteínas envolvidas na manutenção da homeostase de Zn em plantas tem o potencial de beneficiar a agricultura, melhorando o uso dos micronutrientes pelas plantas, assim como indicar abordagens que visam a biofortificação dos grãos, aumentando a qualidade nutricional dos mesmos. Dessa forma, este trabalho tem como objetivo caracterizar o mutante *oszip7* e o papel do transportador OsZIP7 no transporte de Zn em plantas de arroz. O estudo foi desenvolvido no Laboratório de Fisiologia de Plantas de Interesse Agrobiológico da Universidade Federal de Santa Maria. Plantas de arroz da linhagem mutante *oszip7* e do respectivo tipo selvagem (cv. Nipponbare), foram em sala de crescimento e em casa de vegetação, sob sistema hidropônico e submetidas a solução nutritiva: solução controle, excesso de Zn, deficiência de Zn. Após 24 dias de cultivo foram avaliados crescimento de parte aérea, crescimento e estrutura do sistema radicular, massa seca de raízes e de parte aérea, fluorescência da clorofila, concentração de clorofila a/b e carotenoides, atividade das enzimas superóxido dismutase e peroxidase, as concentrações de peróxido de hidrogênio, expressão do gene OsZIP7 por RT-qPCR e quantificação de elementos como Fe e Zn por ICP-OES. Plantas do mutante *oszip7* quando cultivadas em deficiência de Zn, apresentaram um aumento no crescimento de área foliar, comprimento de raízes, diâmetros de raízes e área superficial, quando analisado concentração de elementos nos tecidos de parte aérea plantas do mutante apresentaram uma redução nas concentrações de Zn, quando comparado com o tipo selvagem, a expressão do gene mostrou que *oszip7* é um transportador de baixa afinidade de Zn, ocasionando alteração na homeostase de Zn em plantas de Arroz.

Palavras chaves: Arroz, Transportador, Zinco, Mutantes.

ABSTRACT

Rice is one of the most important crops in the world, being daily food for about half of the world population. However, rice grain is poor in micronutrients such as Fe and Zn, the two most commonly deficient minerals in the human diet. In plants, both Fe and Zn must be absorbed from the soil, distributed and stored in the plant, so that their concentrations are maintained at sufficient but non-toxic levels. The understanding of the mechanisms and proteins involved in the maintenance of Fe and Zn homeostasis in plants has the potential to benefit agriculture, improving the use of micronutrients by plants, as well as to indicate approaches that aim at biofortification of the grains, increasing their nutritional quality. Thus, this work aims to characterize the *oszip7* mutant and the role of the OsZIP7 transporter in Zn transport in rice plants. The study was developed in the Laboratory of Plant Physiology of Agrobiological Interest of the Federal University of Santa Maria. Rice plants of the *oszip7* mutant strain and the respective wild type (Nipponbare cv.) Were grown in a greenhouse under a hydroponic system and submitted to a nutrient solution: control solution, Zn excess, Zn deficiency. After

24 days of growth, shoot growth, root system growth and structure, root and shoot dry mass, chlorophyll fluorescence, chlorophyll a / b and carotenoid concentration, superoxide dismutase and peroxidase activity, concentrations of hydrogen peroxide, expression of the OsZIP7 gene by RT-qPCR and quantification of elements such as Fe and Zn by ICP-OES, plants of the *oszip7* mutant when cultivated in Zn deficiency showed an increase in leaf area growth, root length, root diameters and surface area, when analyzed for elemental concentration in the tissues of shoot plants of the mutant showed a reduction in Zn concentrations when compared with wild type, gene expression showed that *oszip7* is a low affinity transporter of Zn, causing Zn homeostasis and alteration in rice plants.

Key-words: Rice, Transporter, Zinc, Mutants.

4.1 INTRODUÇÃO

O arroz (*Oryza Sativa* L.) é uma planta de ciclo anual pertencente à classe Monocotiledônea, família Poaceae. É base da alimentação para mais da metade da população mundial. (SASAKI e BURR, 2000). Porém, dentre os cereais que são consumidos, o arroz é o que apresenta as mais baixas concentrações de nutrientes como o Zinco (Zn) e Ferro (Fe). O Zn é um elemento essencial para humanos, animais e plantas, e está envolvido em diversos processos bioquímicos como o metabolismo de proteínas, carboidratos, lipídios, RNA e DNA. Em plantas, o Zn desempenha um papel importante no seu crescimento e desenvolvimento, fazendo parte de diversos processos metabólicos, tais como fotossíntese, formação de sacarose e amido, síntese proteica, manutenção da integridade da membrana, metabolismo de auxina, reprodução e regulação da expressão gênica. Portanto, plantas tem que manter as concentrações de Zn dentro de uma faixa ideal, pois tanto a deficiência quanto o excesso desse nutriente acarretará em danos (MARSCHNER, 1995; BARKER, 2007). No organismo humano, o Zn atua no funcionamento de mais de 300 enzimas que estão envolvidas na manutenção de importantes vias metabólicas do organismo, sendo nos processos de diferenciação celular, crescimento, desenvolvimento neurológico e funcionamento do sistema imunológico, defesa antioxidante, crescimento e desenvolvimento (SINCLAIR E KRÄMER, 2012), sendo que a deficiência por Zn acarreta graves distúrbios nutricionais em humanos, podendo ser caracterizada como um problema de saúde pública (PEDRAZA e SALAS, 2015; MARET e SANDSTEAD, 2006).

As deficiências de Zn afetam cerca de 30% da população mundial, sendo uma das principais deficiências minerais em humanos (HAMBIDGE, 2000). Dietas baseadas principalmente em cereais, comuns em países e populações pobres, aumentam os riscos de desnutrição, indicando que esforços para a melhoria da qualidade nutricional de grãos são

necessários (GÓMEZ-GALERA et al., 2010). Neste contexto, a biofortificação surge como uma importante ferramenta. A biofortificação consiste em aumentar as concentrações de nutrientes em partes comestíveis das plantas. No entanto, para elaborar estratégias para aumentar as concentrações de nutrientes como Zn, se faz necessário compreender o papel funcional dos principais genes que controlam a absorção, translocação e armazenamento na planta desses nutrientes (JEONG e GUERINOT, 2008; SPEROTTO et al., 2012; RICACHENEVSKY et al., 2015).

Diversos membros da família ZIP vem sendo estudados como possíveis transportadores de Zn e Fe em diferentes espécies de plantas, sendo eles GmZIP1, MtZIP1, MtZIP5 e MtZIP6 em leguminosas, HvZIP3, HvZIP5, HvZIP7, HvZIP8, HvZIP10 e HvZIP13 em plantas de cevada (MOREAU et al., 2002; LÓPEZ-MILLÁN et al., 2004; TIONG et al., 2015; RICACHENEVSKY et al., 2018). O transportador OsZIP7 vem sendo estudado pelo nosso grupo de pesquisa, sendo que resultados já mostraram que esse transportador está localizado na membrana plasmática, tendo a capacidade de transportar Zn. OsZIP7 é o ortólogo de arroz dos genes de cevada, HvZIP7, de milho, ZmZIP7; e de Arabidopsis, AtIRT3, AtZIP4 e AtZIP9. HvZIP7 foi caracterizado como um transportador de Zn também localizado na membrana plasmática, e que foi altamente induzido em raízes e folhas de plantas sob deficiência de Zn. Ainda assim, mesmo que já se venha se trabalhando bastante para entender como plantas de arroz regulam a absorção e distribuição de Zn, com algumas proteínas já caracterizadas como possíveis transportadores de Zn, a compreensão da homeostase destes metais ainda é incompleta. Sendo assim, este trabalho visa caracterizar um transportador de Zn em arroz, denominado OsZIP7.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Material vegetal e condições de crescimento

O experimento foi realizado em casa de vegetação sob sistema hidropônico. Foram utilizadas sementes de *Oryza sativa* do mutante *oszip7* e de seu respectivo tipo selvagem, cultivar Nipponbare (cv. Nipponbare). As sementes foram submetidas a um protocolo de desinfestação e logo em seguida mantidas em um recipiente com água destilada, sob temperatura constante de 25°C no escuro pelo período de 24 horas. 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 pelo período de sete dias. Posteriormente as plantas foram transferidas para casa de vegetação, onde foram cultivadas em recipientes plásticos com capacidade de dois litros em solução (controle) conforme descrita por Ricachenevsky (2011), pelo período de sete dias para aclimação.

Posteriormente, as plantas foram submetidas aos tratamentos de excesso de Zn (200 µM ZnSO₄), deficiência de Zn (ausência de ZnSO₄) e solução controle, sendo uma unidade experimental composta por um recipiente de dois litros contendo 20 plantas, cultivadas pelo período de 24 dias. A cada três dias foram realizadas as trocas da solução nutritiva e o pH foi ajustado para 5,4 com adição de HCl ou NaOH.

4.2.2 Avaliações biométricas de raízes e área foliar

As plantas foram coletadas aos 24 dias após o início dos tratamentos, para as avaliações biométricas de raízes utilizaram-se raízes de dez plantas de cada genótipo 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 dez plantas de cada genótipo 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.

4.2.3 Produção de matéria seca

No final do experimento (aos 24 dias do início dos tratamentos), a parte aérea e as 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.

4.2.4 Determinação da concentração de peróxido de hidrogênio (H₂O₂)

A coleta das plantas ocorreu aos 24 dias após o início dos tratamentos, sendo que as mesmas foram separadas em folhas e raízes, as quais foram imediatamente congeladas em

nitrogênio líquido e armazenadas em ultrafreezer -80°C . Cada repetição foi composta por 12 plantas, totalizando três repetições. 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 0,1g) 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°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 absorbância de 390 nm. A concentração de H_2O_2 foi expressa em $\mu\text{mol g}^{-1}$ MF (matéria fresca).

4.2.5 Concentração de pigmentos fotossintéticos

A coleta das folhas ocorreu 24 dias após o início dos tratamentos, sendo que imediatamente as folhas foram congeladas em nitrogênio líquido. Posteriormente foram armazenadas em ultrafreezer -80°C . Cada repetição foi composta por 12 plantas, totalizando três repetições. A determinação dos pigmentos fotossintéticos foi de acordo com o método de Hiscox e Israelslam (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°C em dimetilsulfóxido (DMSO) até os pigmentos serem completamente removidos. Para a determinação da clorofila *a*, clorofila *b* e carotenoides, a absorbância da solução foi medida em 663, 645 e 470 nm, respectivamente, utilizando um espectrofotômetro. A clorofila total foi obtida através da soma da clorofila *a* e clorofila *b*.

4.2.6 Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD)

A coleta das plantas ocorreu 24 dias após o início dos tratamentos, sendo que as plantas foram separadas em folhas e raízes, as quais foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em ultrafreezer -80°C . Cada repetição foi composta por 12 plantas, totalizando três repetições. As amostras foram maceradas em nitrogênio líquido e utilizado 0,5 g de folhas e de 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 da 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 μ M, NBT 75 μ M e riboflavina (2 μ M). 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 (ρ -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.

4.2.7 Atividade da enzima peroxidase (POD)

A coleta das plantas ocorreu 24 dias após o início dos tratamentos, sendo que as plantas foram 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 12 plantas, totalizando três repetições. As amostras foram maceradas em nitrogênio líquido e foi utilizado 0,5 g de folhas e de raízes.

A atividade da enzima guaiacol peroxidase foi determinada segundo Zeraik et al. (2008), utilizando-se o guaiacol como substrato. A mistura de reação continha 1,0 mL de tampão fosfato de potássio (100 mM, pH 6,5), 1,0 mL de guaiacol (15 mM) e 1,0 mL de H_2O_2 (3 mM). Após homogeneização, foi adicionado 50 μ L do extrato da planta a esta solução. A atividade da enzima foi medida através da oxidação do guaiacol a tetraguaiacol através do aumento na absorbância a 470 nm. Os resultados foram expressos em unidade de enzima por mg de proteína ($U\ mg^{-1}$ proteína). Para o cálculo, foi utilizado o coeficiente de extinção molar de $26,6\ mM^{-1}\ cm^{-1}$.

4.2.8 Parâmetros fotossintéticos

As avaliações fisiológicas foram realizadas aos 24 dias de tratamento, no terço médio da última folha totalmente expandida do colmo. Foi utilizado um medidor portátil Infra Red

Gas Analyzer (IRGA) marca LI-COR modelo LI-6400 XT, utilizando uma radiação fotossintética de $1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e concentração de CO_2 de $400 \mu\text{mol mol}^{-1}$.

Nessa ocasião foram determinados a taxa de assimilação líquida de CO_2 (A - $\mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$), condutância estomática de vapores de água (G_s - $\text{mol H}_2\text{O}^{-1} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$), concentração intercelular de CO_2 (C_i - $\mu\text{mol CO}_2 \text{mol}^{-1}$), taxa transpiratória (E - $\text{mmol H}_2\text{O}^{-1} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$), a eficiência do uso da água (EUA - $\text{mol CO}_2 \text{mol H}_2\text{O}^{-1}$) foi obtida pela relação entre quantidade de CO_2 fixado pela fotossíntese e quantidade de água transpirada e a eficiência da carboxilação da rubisco (A/C_i) obtida pela relação entre a quantidade de CO_2 fixado pela fotossíntese e a concentração interna de CO_2 .

4.2.9 Concentração de elementos minerais nos tecidos

No final do experimento, ou seja, aos 24 dias do início dos tratamentos, a parte aérea e raízes de quatro plantas por tratamento foram coletadas e secas em estufa de ventilação forçada a 65°C até atingirem peso constante. Posteriormente, foram moídas em moinho do tipo Willey e passadas em peneira com malha de 2 mm. Após as amostras de material vegetal seco e moído foram submetidas à digestão nitroperclórica ($\text{HNO}_3\text{-HClO}_4$) (Embrapa 1997) para determinação da concentração de Cu, Zn, Fe e Mn. Os extratos obtidos de digestão foram determinados em espectrometria de absorção atômica (EAA) (Perkin Elmer, AAnalyst 200, Estados Unidos).

4.2.10 Análises de expressão gênica por RT-qPCR

Aos 24 dias de tratamento foram coletadas raízes, as quais foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em ultrafreezer -80°C , para posterior análise.

Cada amostra foi composta por três plantas de cada genótipo por tratamento. A extração do RNA foi realizada utilizando o reagente TRIzol[®] seguindo as indicações do fabricante, e quantificado utilizando espectrofotômetro Nanodrop[®]. A síntese de cDNA foi realizada utilizando a enzima M-MLV (Invitrogen- Life Technologies Corporation). A reação foi realizada com o uso do aparelho StepOne Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Os dados obtidos foram quantificados de acordo com método de Livak e Schmittgen (2001) e a eficiência da PCR foi analisada conforme descrito por Ricachenevsky et al. (2001).

4.2.11 Análises estatística

As médias dos tratamentos foram comparadas pelo Teste t a 5% de probabilidade de erro.

4.3 RESULTADOS

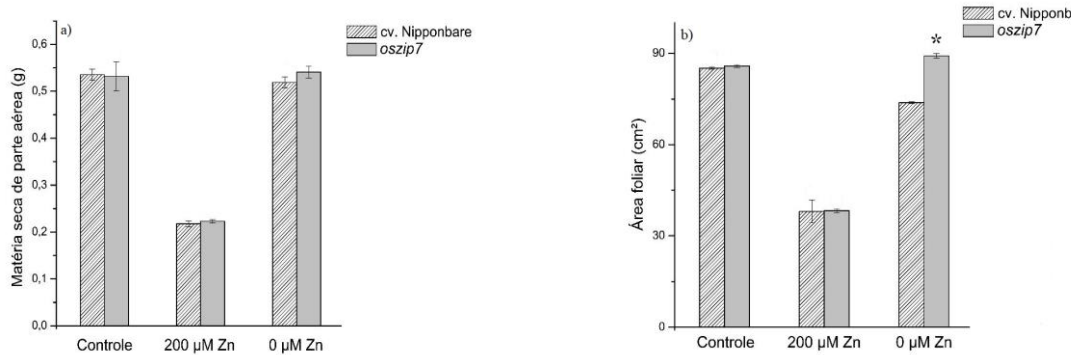
4.3.1 Variáveis de crescimento e concentração de elementos minerais em plantas do tipo selvagem e do mutante *oszip7*

Ao medir parâmetros de crescimento, como área foliar, plantas da linhagem mutante *oszip7* em deficiência de Zn, apresentaram um aumento de 21% quando comparadas com plantas do tipo selvagem (cv. Nipponbare). Quando avaliado matéria seca de parte aérea plantas do tipo selvagem e do mutante não apresentaram diferenças quando cultivadas em solução controle, excesso de Zn, deficiência de Zn e deficiência de Fe (Figura 1b e 1a).

Plantas do mutante *oszip7* quando cultivadas em deficiência de Zn, apresentaram um aumento de comprimento de raízes, diâmetro de raízes, e área superficial em torno de duas vezes maior, quando comparado com o tipo selvagem. Já quando as plantas foram cultivadas em solução controle, o mutante apresentou uma redução de 67% na área superficial de raízes (Figura 2c), sendo que o mesmo também apresentou uma redução de 75% no comprimento radicular (Figura 2d), quando comparado com plantas do tipo selvagem. Quando as plantas foram cultivadas em deficiência de Fe o mutante apresentou uma redução na área superficial e no comprimento radicular (Figura 2c e 2d), entretanto o mutante apresentou um aumento no diâmetro radicular, quando comparado com o tipo selvagem.

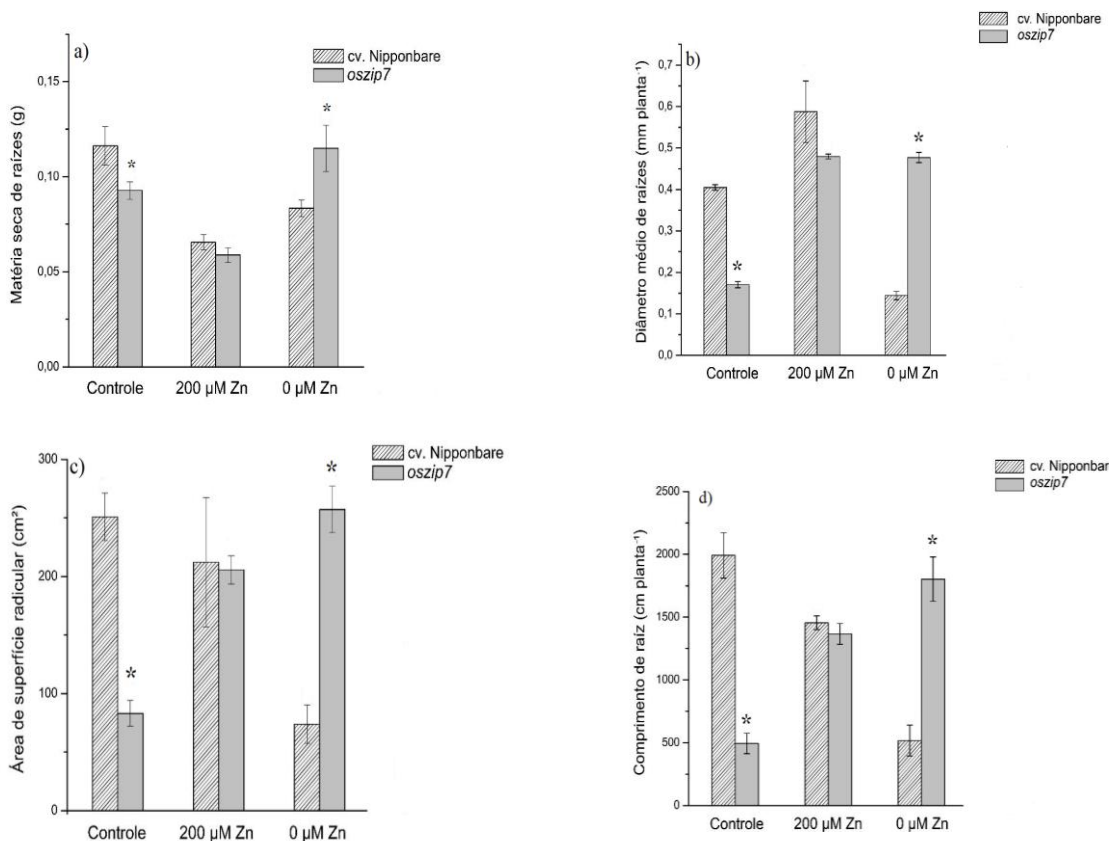
Quando avaliado matéria seca de raízes, o mutante cultivado em solução controle apresentou uma redução, quando comparado com o tipo selvagem. Já quando as plantas foram cultivadas sob deficiência de Zn, o mutante apresentou um aumento de 37% na matéria seca das raízes quando comparado com o tipo selvagem (Figura 2a).

Figura 1 - Matéria seca de parte aérea (a) e área foliar (b) de plantas de arroz do tipo selvagem (cv. Nipponbare) e do mutante *oszip7* aos 24 dias de tratamento.



* indica diferença estatisticamente significativa entre o tipo selvagem e o mutante *oszip7* no mesmo tratamento pelo Teste t ($P < 0,05$).

Figura 2- Massa seca de raízes (a), diâmetro médio de raízes (b), área superficial radicular (c) e Comprimento de raízes (d) de plantas de arroz do tipo selvagem (cv. Nipponbare) e do mutante *oszip7* aos 24 dias de tratamento.

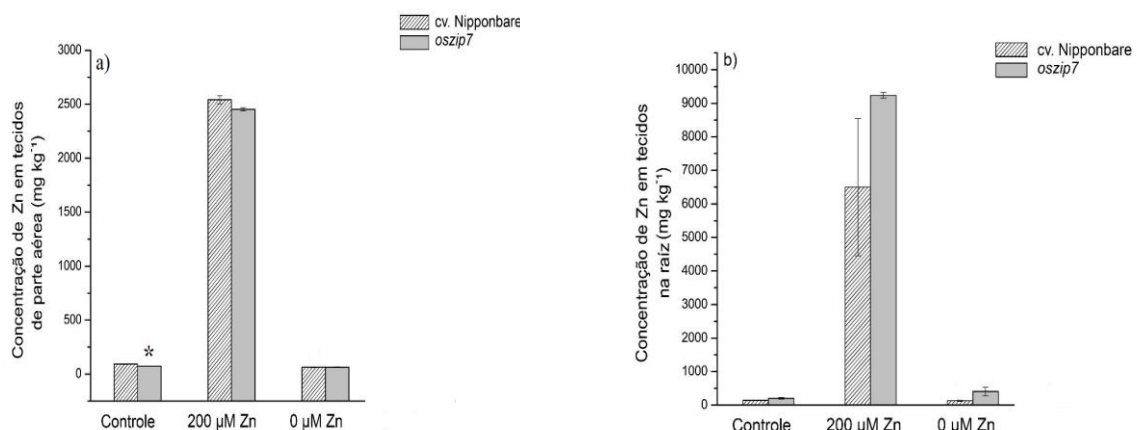


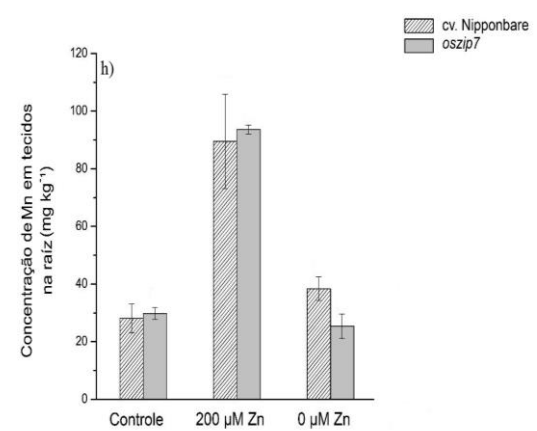
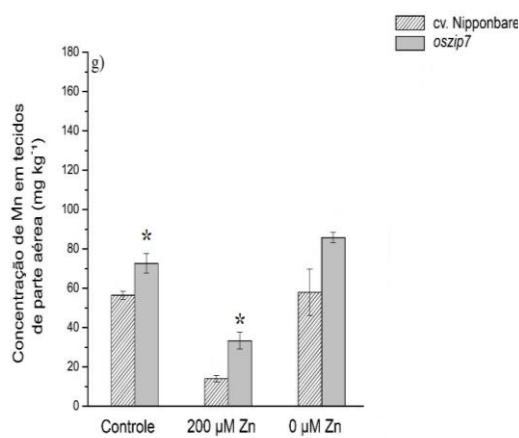
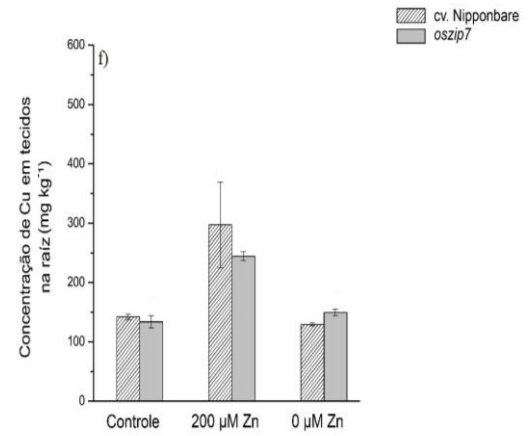
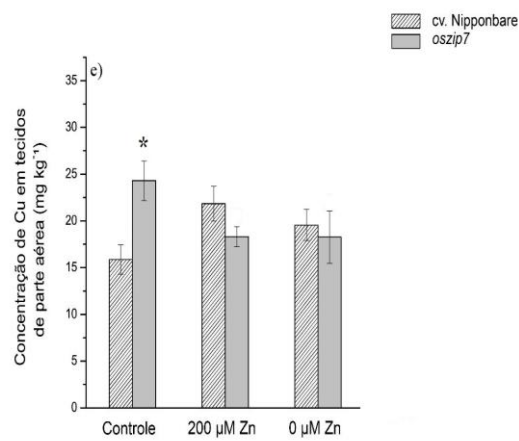
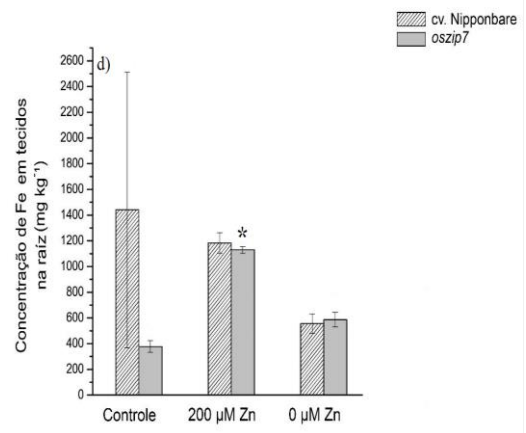
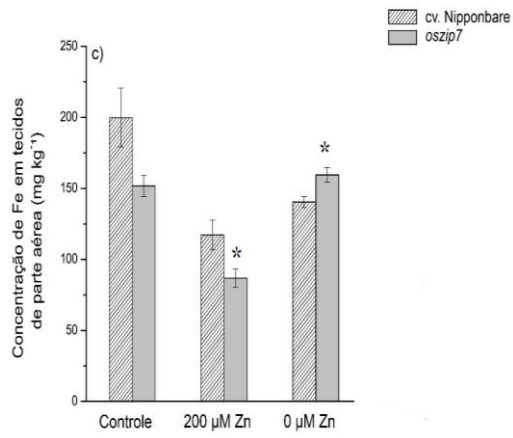
* indica diferença estatisticamente significativa entre o tipo selvagem e o mutante *oszip7* no mesmo tratamento pelo Teste t ($P < 0,05$).

Após 24 dias de exposição aos tratamento, plantas do mutante *oszip7*, quando cultivados sob condições controle, apresentaram uma redução de 23% da concentração de Zn nos tecidos da parte aérea (Figura 3a). Porém, as concentrações de Zn em tecidos radiculares não apresentaram diferenças entre o mutante *oszip7* e plantas do tipo selvagem em todos os tratamentos (Figura 3b). As concentrações de Fe em tecidos de parte aérea e tecidos radiculares foram menores em plantas do mutante *oszip7* quando cultivadas em excesso de Zn. Já quando as plantas foram cultivadas sob deficiência de Zn apresentaram uma redução de 14% na concentração de Fe em tecidos de parte área, não diferenciando de plantas do tipo selvagem (Figura 3c e 3d). Plantas do mutante *oszip7* apresentaram maior concentração de Cu nos tecidos da parte área quando cultivadas no tratamento controle, sendo 53% maior em comparação com plantas do tipo selvagem (Figura 3e).

Plantas do mutante *oszip7* apresentaram maior concentração de Mn em tecidos de parte aérea quando cultivadas em tratamento controle e em excesso de Zn, sendo 30% e 49% respectivamente. As concentrações de Mn nos tecidos radiculares não apresentaram diferenças entre o mutante e o tipo selvagem em nenhum dos tratamentos (Figura 3g e 3 h).

Figura 3- Concentração de Zn (a), Fe (c), Cu (e) e Mn (g) em tecidos de parte aérea e de Zn (b), Fe (d), Cu (f) e Mn (h) em tecidos de raízes de plantas de arroz do tipo selvagem (cv. Nipponbare) e do mutante *oszip7* aos 24 dias de tratamento.



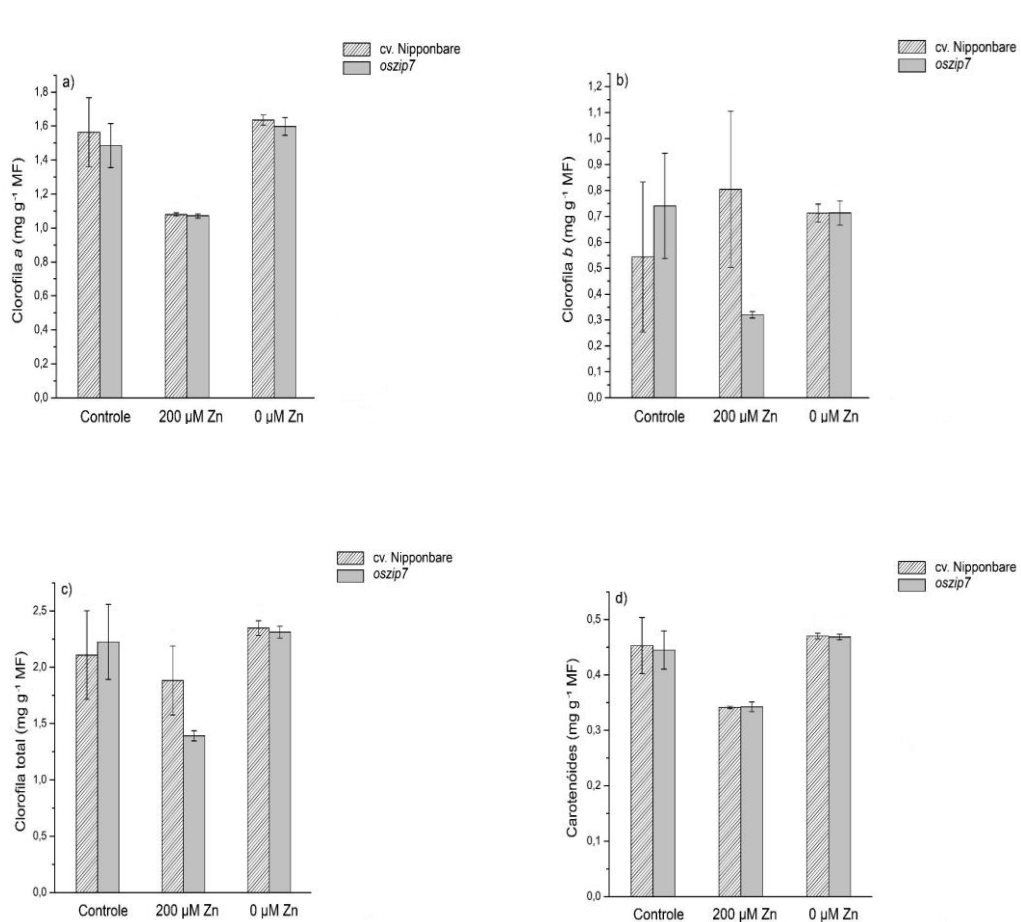


* indica diferença estatisticamente significativa entre o tipo selvagem e o mutante *oszip7* no mesmo tratamento pelo Teste t ($P < 0,05$).

4.3.2 Pigmentos fotossintéticos

Para os pigmentos fotossintéticos, clorofila *a*, clorofila *b*, clorofila total (*a* + *b*) e carotenoides, não se observou diferença significativa, entre plantas do tipo selvagem e a linhagem mutante *oszip7*, quando cultivadas em solução controle, excesso de Zn, deficiência de Zn ou deficiência de Fe (Figura 4a, 4b, 4c e 4d).

Figura 4- Clorofila *a* (a), clorofila *b* (b), clorofila total (c) e carotenoides (d) de plantas de arroz do tipo selvagem (cv. Nipponbare) e do mutante *oszip7* aos 24 dias de tratamento.

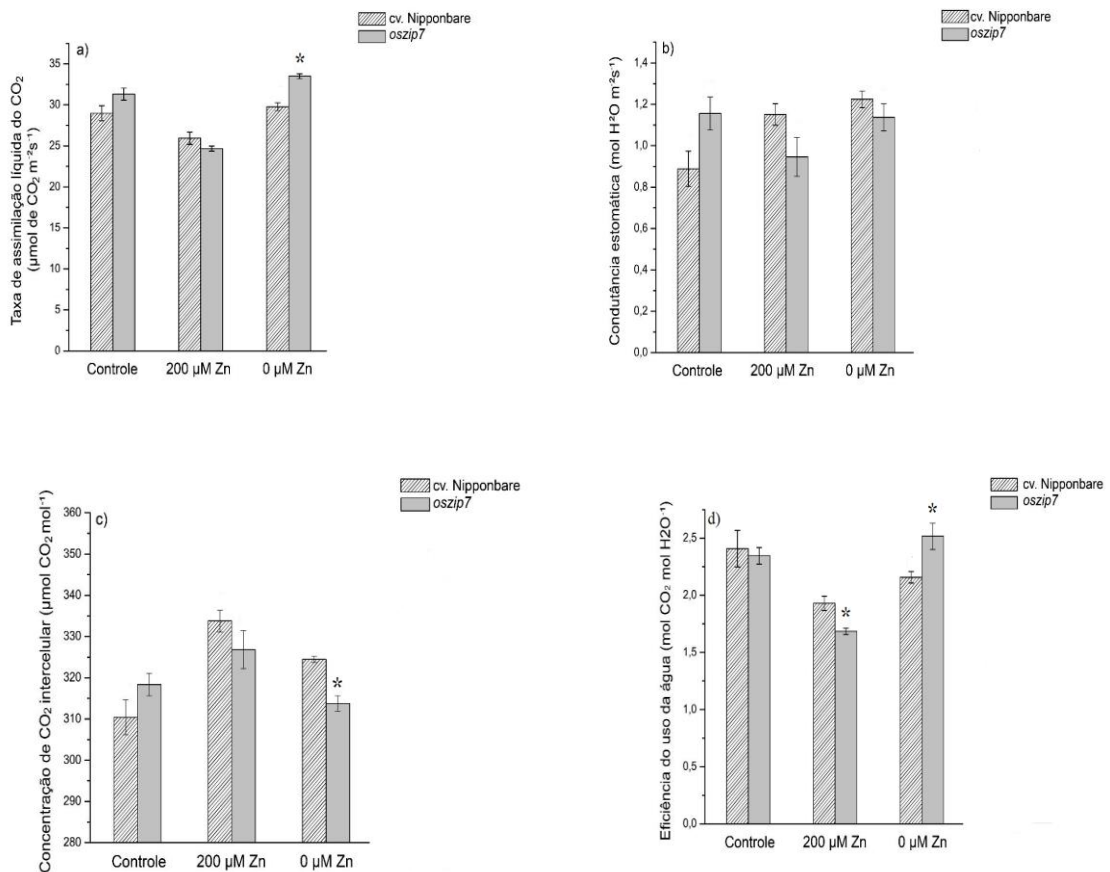


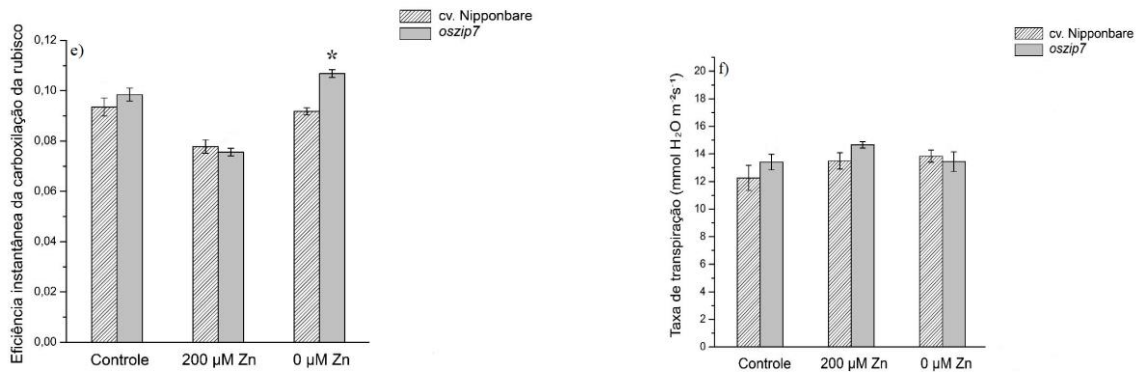
* indica diferença estatisticamente significativa entre o tipo selvagem e o mutante *oszip7* no mesmo tratamento pelo Teste t ($P < 0,05$).

4.3.3 Parâmetros fotossintéticos

Nos parâmetros fotossintéticos avaliados após 24 dias de tratamento, observou-se que plantas do mutante *oszip7*, quando cultivadas sob deficiência de Zn, apresentaram maior taxa de assimilação líquida de CO₂ (A), uma maior eficiência do uso da água (EUA) e uma maior eficiência do da carboxilação da rubisco (A/CI), bem como uma menor concentração de CO₂, quando comparadas com o tipo selvagem (Figura 5a, 5b e 5c). Já quando cultivado em excesso de Zn, o mutante *oszip7* apresentou uma redução de 13% na eficiência do uso da água (EUA) (Figura 5d).

Figura 5 – Taxa de assimilação líquida (a), condutância estomática (b), concentração de CO₂ intercelular (c), eficiência do uso da H₂O (d), eficiência da carboxilação da rubisco (e) e taxa de transpiração (f) em plantas de arroz do tipo selvagem (cv. Nipponbare) e do mutante *oszip7* aos 24 dias de tratamento.



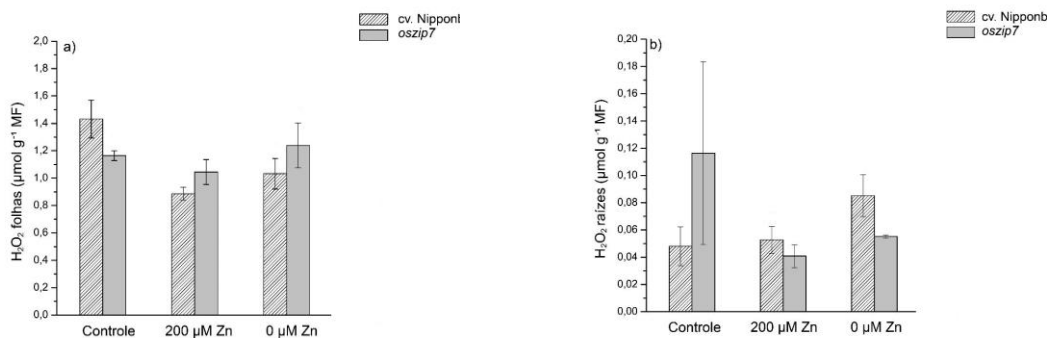


* indica diferença estatisticamente significativa entre o tipo selvagem e o mutante *oszip7* no mesmo tratamento pelo Teste t ($P < 0,05$).

4.3.4 Concentração de H₂O₂

As concentrações de H₂O₂ nos tecidos das raízes e folhas, não apresentaram diferenças significativas, entre plantas do tipo selvagem e da linhagem mutante *oszip7*, quando cultivadas em solução controle, excesso de Zn, deficiência de Zn e deficiência de Fe (Figura 6a e 6b).

Figura 6- Concentração de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em raízes (a) e em folhas (b) plantas de arroz do tipo selvagem (cv. Nipponbare) e do mutante *oszip7* aos 24 dias de tratamento.

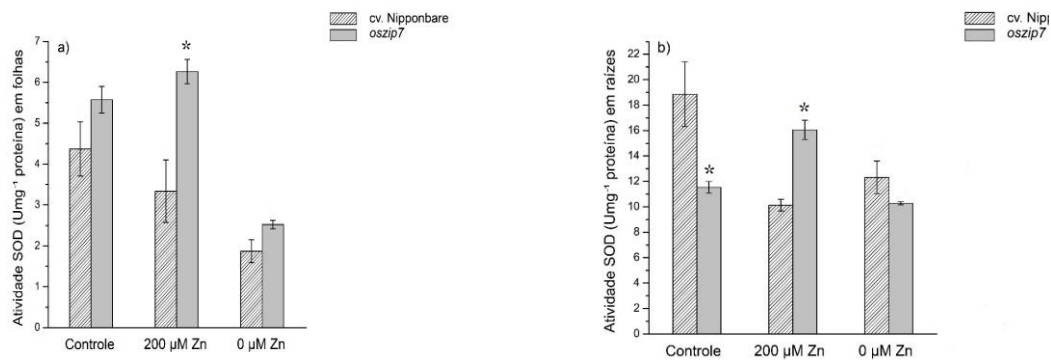


* indica diferença estatisticamente significativa entre o tipo selvagem e o mutante *oszip7* no mesmo tratamento pelo Teste t ($P < 0,05$).

4.3.5 Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD)

Nos tecidos foliares, o mutante *oszip7* apresentou um aumento de 88% na atividade da enzima SOD em relação ao tipo selvagem apenas quando cultivado sob excesso de Zn (Figura 7a). Já nas raízes o mutante *oszip7* apresentou um aumento na atividade da enzima SOD em relação ao tipo selvagem quando cultivado em excesso de zinco. Quando cultivado em solução controle o mutante *oszip7* apresentou uma redução de 40% na atividade da enzima SOD em relação ao tipo selvagem. (Figura 7b).

Figura 7- Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) em raízes (a) e em folhas (b), de plantas de arroz do tipo selvagem (cv. Nipponbare) e do mutante *oszip7* aos 24 dias de tratamento.

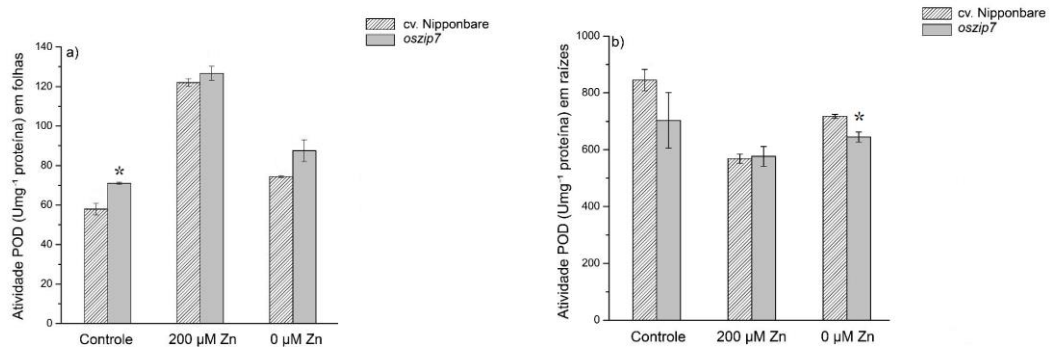


* indica diferença estatisticamente significativa entre o tipo selvagem e o mutante *oszip7* no mesmo tratamento pelo Teste t ($P < 0,05$).

4.3.6 Atividade da enzima peroxidase (POD)

Nos tecidos foliares o mutante *oszip7* apresentou um aumento de 23% na atividade da enzima POD em relação ao tipo selvagem apenas quando cultivado em solução controle (Figura 8 a). Nos tecidos das raízes o mutante *oszip7* apresentou uma pequena redução na atividade das enzimas POD em relação ao tipo selvagem quando cultivado em deficiência de Zn (Figura 8 b).

Figura 8- Atividade da enzima peroxidase (POD) em raízes (a) e em folhas (b), de plantas de arroz do tipo selvagem (cv. Nipponbare) e do mutante *oszip7* aos 24 dias de tratamento.

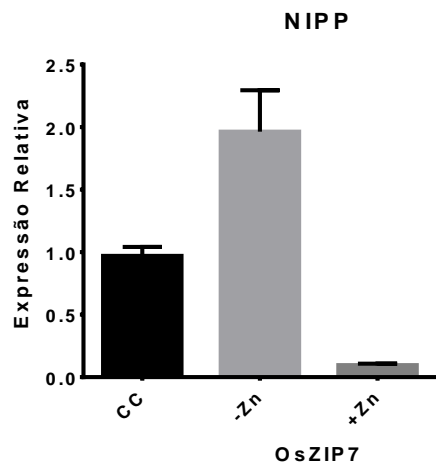


* indica diferença estatisticamente significativa entre o tipo selvagem e o mutante *oszip7* no mesmo tratamento pelo Teste t ($P < 0,05$).

4.3.7 Análise da expressão gênica no tipo selvagem

Quando analisado a expressão do gene *OsZIP7* em raízes plantas do tipo selvagem, observou-se uma maior expressão em deficiência de Zn, porém em excesso de Zn ocorreu uma redução na expressão do gene *OsZIP7* (Figura 9).

Figura 9- Expressão do gene *oszip7* em raízes de plantas de arroz do tipo selvagem (cv. Nipponbare) aos 24 dias de tratamento.



4.4. DISCUSSÃO

Embora venha se trabalhando bastante para entender como plantas de arroz regulam a absorção e distribuição de Zn em seus tecidos, com algumas proteínas já caracterizadas como possíveis transportadores deste metal, a compreensão da homeostase do mesmo ainda é bastante incompleta. Estudos já mostraram que alguns membros da família ZIP são capazes de transportar Zn, tanto em leguminosas, como soja, quanto em gramíneas, como arroz e cevada (MOREAU et al., 2002; RAMESH et al., 2003, MILNER et al., 2013, TIONG et al., 2014). O transportador OsZIP7 vem sendo estudado pelo nosso grupo de pesquisa, sendo que resultados já mostraram que esse transportador está localizado na membrana plasmática e que é capaz de complementar leveduras mutantes para transporte de Zn (RICACHENEVSKY et al., 2018), Também foi mostrado que OsZIP7, quando expresso em *Arabidopsis thaliana* sob controle de um promotor constitutivo, faz com que as plantas acumulem maiores concentrações de Zn em tecidos foliares. OsZIP7 é o ortólogo em arroz dos genes HvZIP7 de cevada e ZmZIP7 de milho (TIONG et al., 2014; LI et al., 2016). Em *Arabidopsis*, OsZIP7 é bastante similar a um grupo de genes do qual fazem parte AtIRT3, AtZIP4 e AtZIP9 (TIONG et al., 2014). Assim como OsZIP7, a maior parte destes genes se localiza na membrana plasmática, e alguns tem capacidade de complementar leveduras mutantes que não transportam Zn de maneira eficiente para o citoplasma.

Os estudos realizados expressando OsZIP7 de maneira constitutiva em plantas de *Arabidopsis*, bem como a super-expressão de HvZIP7 em plantas de cevada, são consistentes com a hipótese de que ambos são transportadores de baixa afinidade de Zn (RICACHENEVSKY et al., 2018; TIONG et al. 2014). Neste trabalho, analisando parâmetros de crescimento, comprimento de raiz, área superficial, diâmetro médio e volume de raiz, o mutante *oszip7* quando cultivado em solução controle apresentou redução quando comparado ao tipo selvagem (Figura 2c, 2d e 2b). Estes dados podem sugerir que OsZIP7 é um transportador de baixa afinidade, com papel relevante na absorção de Zn em condições de suficiência. Consistentemente, o mutante *oszip7* apresenta concentrações de Zn ligeiramente mais baixas na parte aérea em condições controle, quando comparado com o tipo selvagem (Figura 3a). Apesar de a expressão de *OsZIP7* ser induzida sob deficiência de Zn prolongada, e inibida sob excesso de Zn (Figura 9), este dado ainda concorda com a hipótese de OsZIP7 se tratar de um transportador de baixa afinidade. Também observamos expressão de OsZIP7 bastante reduzida em excesso de Zn. Em *Arabidopsis*, é sabido que excesso de Zn leva à uma

resposta de deficiência de Fe secundária (SHANMUGAM et al., 2011), o que pode explicar essa observação.

Também observamos que o mutante *oszip7* apresentou variáveis de crescimento melhor que plantas de Nipponbare quando ambos foram cultivados deficiência de Zn (Figura 2c, 2d e 2b). O mutante *oszip7* também apresentou aumento de área foliar quando cultivado em deficiência de zinco quando comparado com o tipo selvagem (Figura 1b), sendo que Marschener (1995) relata que a deficiência de zinco provoca maior ramificação da parte aérea em plantas.

Entretanto, plantas *oszip7* e tipo selvagem, quando cultivados sob deficiência de Zn, excesso de Zn, não apresentaram diferenças na concentração de Zn em folhas e nas raízes (Figura 3a e 3b). Em estudo realizado por Ricachenevsky et al. (2018), as concentrações de Zn foram significativamente maiores nos tecidos de parte aérea de plantas OsZIP7-FOX cultivadas sob excesso de Zn, quando comparadas com o tipo selvagem, sendo que esses resultados também foram observados por Tiong et al. (2014) em plantas de cevada super-expressando HvZIP7. Em ambos os casos citados na literatura, as alterações nas concentrações de Zn em tecidos são mais drásticas do que as que observamos. Porém, tratam-se de plantas expressando transportadores de Zn de maneira constitutiva e utilizando promotores fortes, o que pode resultar em observações diferentes do que ocorreria em um contexto mais fisiológico. No mutante *oszip7*, no entanto, temos a perda de função de OsZIP7. Mutações de perda-de-função tendem a ser de mais fácil interpretação do que plantas super-expressando genes, porém podem levar a alterações fenotípicas mais sutis. Portanto, os dados ainda sustentam a hipótese de OsZIP7 ser um transportador de Zn de baixa afinidade.

Os transportadores de metais podem ser classificados em transportadores de baixa afinidade e transportadores de alta afinidade. Uma hipótese plausível é que plantas mutantes *oszip7* podem ter aumentado a expressão de transportadores de alta afinidade, o que pode explicar as observações realizadas nos parâmetros de área foliar, bem como nos parâmetros fotossintéticos onde foi observado que o mutante *oszip7* apresentou uma maior taxa de assimilação líquida quando cultivados em deficiência de Zn (Figura 5a) e por consequência uma menor concentração de CO₂ intercelular (Figura 5c) e uma maior eficiência do uso da água (Figura 5d). A presença de transportadores de alta afinidade poderia tornar as plantas *oszip7* mais aclimatadas à deficiência de Zn, e, portanto, respondendo de maneira mais eficiente. Mesmo em deficiência de Zn o mutante apresentou maior área foliar quando comparado com o tipo selvagem (Figura 1b). Entretanto, os pigmentos fotossintéticos tanto em plantas do tipo selvagem quanto do mutante *oszip7* se comportaram de forma igual, ou seja, não apresentando

alteração em condições de deficiência de Zn, sendo que tanto área foliar quanto pigmentos desempenham papel importante no processo fotossintético nas plantas.

Com o objetivo de controlar o nível de EROs e proteger as células do dano oxidativo, as plantas possuem enzimas antioxidantes (GRATÃO et al., 2005). As enzimas SOD são consideradas as mais efetivas do sistema antioxidante na redução das EROs (GILL; TUTEJA, 2010), as quais são responsáveis pela conversão do $O_2^{\bullet-}$ (ânion superóxido) em H_2O_2 e O_2 , reduzindo assim a possibilidade da reação de Haber-Weiss, pois $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 são substratos para essa reação (GILL et al., 2015; GILL; TUTEJA, 2010). Nesse estudo observou-se que nos tecidos foliares e nos tecidos radiculares, o mutante *oszip7* houve um aumento na atividade das enzimas SOD em relação ao tipo selvagem apenas quando cultivado sob excesso de Zn (Figuras 7a, 7b), indicando que o excesso de Zn gerou níveis tóxicos de EROs, sendo que essa enzima respondeu de forma positiva ao aumento da concentração de Zn nos tecidos de parte aérea e tecidos radiculares com intuito de proteger as células do potencial dano do estresse oxidativo. Mais uma vez, se considerarmos a hipótese de que plantas *oszip7* perderam a função de um transportador de baixa afinidade, e, portanto, tem a expressão de transportadores de alta afinidade ligeiramente induzida, é possível que o excesso de Zn tenha efeitos mais drásticos nessas plantas. Essa hipótese, porém, ainda necessita ser testada.

A expressão do gene OsZIP7 em raízes de plantas do tipo selvagem foi maior quando as plantas foram submetidas a deficiência de Zn, sendo que esse resultado mostra que o OsZIP7 é regulado positivamente por deficiência de Zn e negativamente por excesso de Zn. Em estudo realizado com cevada, apresentaram resultados semelhantes aos que encontramos, pois quando plantas foram expostas à deficiência de Zn, a expressão do gene HvZIP7 foi altamente induzido nas raízes (TIONG et al., 2014). Em geral, transportadores de baixa afinidade são considerados não-induzidos em situações de deficiência do seu substrato. Porém, outros transportadores similares à OsZIP7 apresentam essas mesmas características, o que nos leva a sugerir que OsZIP7 é um transportador de baixa afinidade induzido por deficiência de Zn prolongada e inibido por excesso de Zn.

4.5 CONCLUSÕES

Nossos dados permitem sugerir que OsZIP7 é um transportador de baixa afinidade de Zn, e que sua perda de função altera a homeostase de Zn em plantas de arroz. A hipótese de que transportadores de alta afinidade, como OsZIP4, OsZIP5 e OsZIP8 possam ter maior expressão no mutante deve ser testada.

5. REFERÊNCIAS

- BARKEAR, A. V.; PILBEAN, D. J. **Handbook of Plant Nutrition**, 2. ed. New York: CRC, 613 p. 2007.
- GRATÃO, P. L. et al. Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. **Functional Plant Biology**, v.32, n.6, p.481-494, 2005.
- 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, Apr. 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, May. 2010.
- GÓMEZ-GALERA, E. T. S.; ROJAS, E.; SUDHAKA, D.; ZHU, C.; PELACHO, A. M.; CAPELL, T.; CHRISTOU, P. Critical evaluation of strategies for mineral fortification of staple food crops. **Transgenic Res**, v. 19, p.165-80, Apr. 2010.
- HAMBIDGE, M. Human zinc deficiency. **Journal of nutrition**, v. 130, n. 5, p. 13445-13449, May. 2000.
- JEONG, J.; GUERINOT, M. L. Biofortified and bioavailable: The gold standard for plant diets. **Panas**, v. 105, n. 6, p. 1777-1778, Feb. 2008.
- LI, S.; ZHOU, X.; ZHAO, Y.; LI, H.; LIU, Y.; ZHU, L. Constitutive expression of the ZmZIP7 in Arabidopsis alters metal homeostasis and increases Fe and Zn content. **Plant Physiol**, v.106, p. 1-10, July. 2016.
- LÓPEZ-MILLÁN, A. F.; ELLIS, D. R.; GRUSAK, M. A. Identification and characterization of several new members of the ZIP family of metal ion transporters in *Medicago truncatula*. **Plant Mol Biol**, v. 54, n. 4, p. 583-96, Mar. 2004.
- MARSCHENER, H. **Marschner's mineral nutrition of higher plants**, 2. ed. Academic press, 1995. 889p.
- MARET, W.; SANDSTEAD, H. H. Zinc requirements and the risks and benefits of zinc supplementation. **Med. Biol** v.20, p. 3-18, Abr. 2006.
- MILNER, M. J.; SEAMON, J.; CRAFT, E.; KOACHIAN, L. V. Transport properties of members of the ZIP family in plants and their role in Zn and Mn homeostasis. **Journal of Experimental Botan**, v. 64, n.1, p.369-381, Jan. 2013.
- MOREAU, S.; THOMSON, R. M.; KAISER, B. N.; TREVASKI, B.; GUERINOT, M. L.; UDVAR, M. K.; PUPPO, A.; DAY, D. A. GmZIP1 encodes a symbiosis-specific zinc transporter in soybean. **J Biol Chem**, v. 277, n. 7, p. 4738-4746, Feb. 2002.
- SINCLAIR, S. A., KRÄMER, U. The zinc homeostasis network of land plants. **Biochim Biophys Acta**, v. 1823, n.12, p. 1553-1567, Sept. 2012.

RAMESH, S. A.; SHIN, R.; EIDE, D. J.; SCHACHTMAN, D. P. Differential metal selectivity and gene expression of two zinc transporters from rice. **Plant Physiology**, Washington, v. 133, n. 1, p. 126-134, Sept. 2003.

RICACHENEVSKY, F. K.; SPEROTTO, R. A.; MENQUER, P. K.; SPERB, E. R.; LOPES, K. L.; FETT, J. P. 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, n. 1, p. 120, Jan. 2011.

RICACHENEVSKY, F.K.; MENGUER, P.K.; SPEROTTO, R.A.; FETT, J.P. Got to hide your Zn away: molecular control of Zn accumulation and biotechnological applications. **Plant Sci**, v. 236, p. 1-17, July. 2015.

RICACHENEVSKY, F.K.; PUNSHON, T.; LEE, S.; FETT, J.P.; OLIVEIRA, N.H.B.; TRENTZ, T.; MARASCHIV, F.S.; HINDT, M.N.; DUNKU, J.; SALT D.E.; GUERINOT, M.L. Elemental Profiling of Rice FOX Lines Leads to Characterization of a New Zn Plasma Membrane Transporter, OsZIP7. **Plant Sci**, v.9, p. 865, July. 2018.

SASAKI, T.; BUR, B. International rice genome sequencing Project: The effort to completely sequence the rice genome. **Curr opin Plant Bio**, v. 3, n. 1, p. 138-141, Apr. 2000.

SHANMUGAM, V.; LO, J.C.; WANG, S.L.; LAI, C.C.; CONNLLY, E.L.; HUANG, J.L.; YEH, K.C. Differential expression and regulation of iron-regulated metal transporters in *Arabidopsis halleri* and *Arabidopsis thaliana*--the role in zinc tolerance. **New Phytol**. v.7, p.125-137, Jan. 2011.

SAHRAWAT, K. L.; SIKA, M. Comparative tolerance of *Oryza sativa* and *O. glaberrima* rice cultivars for iron toxicity in West Africa. **Int. Rice Res.**, v. 27, p.30-33, May. 2002.

SINCLAIR, S.A., KRAMER, U. The zinc homeostasis network of land plants. **Biochim. Biophys.** p. 1553-1567, Abr. 2012.

SPEROTTO, R.A.; RICACHENEVSKY, F.K.; WALDOW, V. A.; FETT, J.P.; GUERINOT M.L. Iron biofortification in rice: it's a long way to the top. **Plant Sci**, v. 190, p. 24-39, July. 2012.

TIONG, J.; McDONALD, G.; GENC, Y.; SHIRLEY, N.; LANGREDGE, P.; HUANG, Y. Increase d expression of six ZIP family by zinc (Zn) deficiency is associated with enhanced up take and root-to-shoot translocation of Zn in balley (*Hordeum vulgare*). **New Phytologist**, v. 207, n. 1, p. 1097-1109, Jan. 2015.

TIONG, J.; McDONALD, G.K.; GENC Y.; PEDAS, P.; HAYES, J.E.; TOUBIA, J. HvZIP7 mediates zinc accumulation in barley (*Hordeum vulgare*) at moderately high zinc supply. **New Phytol**, v. 201, p. 134-143, July. 2014.

6. DISCUSSÃO GERAL

Diversas proteínas têm sido descritas como tendo um papel na homeostase de metais em plantas de diversas espécies, sendo que várias proteínas da família ZIP tem se mostrado capazes de transportar Zn. Apesar de conhecida há mais de duas décadas, em plantas, o papel da família ZIP na homeostase de Zn ainda é pouco conhecido, possivelmente devido à redundância funcional entre transportadores similares, o que dificulta o entendimento do papel fisiológico dos mesmos utilizando mutantes com perda-de-função. Porém, é claro que estes transportadores podem transportar Zn, e que a manipulação dos mesmos pode ter valor para a biofortificação.

Nesse estudo realizado com plantas de arroz, *oszip7* parece ser um transportador de baixa afinidade de Zn e uma vez que HvZIP7 quando super-expresso em plantas de cevadas, apresenta um aumento nas concentrações de Zn em sementes (TIONG et. al. 2014) e, portanto, OsZIP7 pode ser um bom candidato para super-expressão visando aumento das concentrações de Zn em grãos de arroz. Vindo ao encontro dessa possibilidade, plantas de Arabidopsis expressando OsZIP7 de maneira constitutiva também acumulam mais Zn nas sementes, sendo que o ZmZIP7 quando também foi expresso em Arabidopsis apresentou um aumento nas concentrações de Zn nas sementes.

Em nosso estudo ainda se faz necessário a realização da quantificação das concentrações de Zn em sementes, para poder constatar possíveis alterações no mutante *oszip7* em plantas de arroz. Até o momento, esse trabalho já acrescenta informações sobre possíveis função fisiológica de OsZIP7, as quais são novas na literatura.