

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

Jover da Silva Alves

**INTERAÇÃO ENTRE A DEFICIÊNCIA DE FERRO E TOXIDEZ POR ALUMÍNIO
EM *Oryza rufipogon* E *Oryza sativa***

Santa Maria, RS, Brasil

2019

Jover da Silva Alves

**INTERAÇÃO ENTRE A DEFICIÊNCIA DE FERRO E TOXIDEZ POR ALUMÍNIO
EM *Oryza rufipogon* E *Oryza sativa***

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

Orientadora: Prof^a Dr^a. Luciane Almeri Tabaldi

Santa Maria, RS

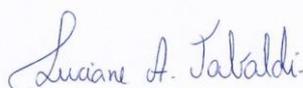
2019

Jover da Silva Alves

**INTERAÇÃO ENTRE A DEFICIÊNCIA DE FERRO E TOXIDEZ POR ALUMÍNIO
EM *Oryza rufipogon* E *Oryza sativa***

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

Aprovado em 11 de dezembro de 2019:



Luciane Almeri Tabaldi, Dra. (UFSM)
(Presidente/Orientadora)



Felipe Klein Ricachenevsky, Dr. (UFSM)
Co-orientador



Paloma Koprovski Menguer, PhD. (UFRGS)



Raul Antonio Sperotto, Dr. (Univates) – Videoconferência

Santa Maria, RS

2019

DEDICATÓRIA

Aos que eu sempre terei orgulho dos laços de afeto, minha família, meus grandes amores (em ordem alfabética) Milton, Theo, Vevê, dedico.

Amo vocês, sempre.

AGRADECIMENTOS

Sempre acreditei em uma energia maior que todos nós e onipresente guiando o universo como um grande arquiteto. Dou início agradecendo a essa energia que sempre me acompanha, por me permitir viver isso e, mesmo que por linhas as vezes tortas, conspirar ao meu favor.

Obrigado ao povo brasileiro, que com o seu trabalho, é o maior financiador do ensino público e de qualidade ao qual tive acesso.

Agradeço à minha segunda casa, UFSM, por ter sido cenário de tantos momentos incríveis, felizes, tristes e engrandecedores. Sou devidamente grato por cada professor, técnico administrativo e funcionário, que juntos fazem uma universidade melhor para todos.

Ao programa de Pós Graduação em Agrobiologia e à CAPES pela concessão da bolsa.

Aos grandes professores que tive a oportunidade de conviver durante o mestrado. Saliento aqui a Prof.^a Lu, por me acolher antes mesmo de eu iniciar a graduação, em 2012, me apresentando à Fisiologia Vegetal e aos metais, e por ter sido essa figura tão importante (falo por mim e pelos outros orientandos) nesses últimos anos, ultrapassando as barreiras da orientação e sendo amiga -me atrevo a dizer, mãe- quando necessário. E o Felipe, responsável por parte da minha curiosidade -e encanto- pelas plantas, em especial pelo arroz, e por topiar encarar comigo o doutorado. Obrigado por me mostrar que a ciência não precisa ser justificada. Existem professores nos quais todo aluno que sonha em ser professor se inspira, vocês dois são exemplos disso.

Aos colegas de laboratório e de pós-graduação Vicky, Jéssica, Bruno, Rafa, Charles, Gabriela, Gerâne e Daiane. Em especial ao Bruno pela ajuda nas análises moleculares e à Vicky, que além de me salvar nas análises bioquímicas, junto com a Jé foram grandes amigas durante todo esse processo, trabalhar com vocês nunca é maçante, sempre foi e sempre será um prazer! Aos ICs do Laboratório de Fisiologia Vegetal, alguns presentes no início e outros no final, (em ordem cronológica, mas independentemente do tempo) Olga, Géssica, Gabi, Luana, Franco, Letícia, Thalia, Flaiane e Pedro.

A quem dediquei esse trabalho, minha família, meu porto, meu alicerce. Obrigado por todo o suporte e por sempre acreditarem em mim, muitas vezes até mais do que eu. Não existem palavras que mensurem minha gratidão e meu amor.

À Cinthia, Eduardo, Helena e Henrique (ordem alfabética), obrigado por fazerem de SM meu lar e serem minha segunda família. O suporte de vocês também foi imprescindível.

A todos que de alguma forma colaboraram para a realização desse trabalho, meu sincero muito obrigado!

The important thing is not to stop questioning.

Curiosity has its own reason for existing.

Albert Einstein

RESUMO

INTERAÇÃO ENTRE A DEFICIÊNCIA DE FERRO E TOXIDEZ POR ALUMÍNIO EM *Oryza rufipogon* E *Oryza sativa*

AUTOR: Jover da Silva Alves
ORIENTADORA: Luciane Almeri Tabaldi

O arroz é um dos cereais mais cultivados e consumidos ao redor do mundo, sendo alimento base para mais da metade da população mundial. Em função de sua ampla distribuição de cultivo, a cultura do arroz é exposta às mais diversas condições climáticas e ambientais e, conseqüentemente, vários estresses abióticos. Entre os estresses os quais o arroz é exposto está a deficiência de ferro (Fe) e a toxidez por alumínio (Al), dois grandes problemas da agricultura mundial. Nesse contexto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a resposta da espécie selvagem de arroz *Oryza rufipogon* e da espécie cultivada *Oryza sativa* cultivar IRGA 429 submetidos à deficiência de Fe e toxidez de Al quanto às variáveis fisiológicas, bioquímicas e expressão de genes ligados à deficiência de ferro e toxidez de alumínio. Os experimentos foram desenvolvidos no Laboratório de Fisiologia de Plantas de Interesse Agrobiológico da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), em Santa Maria (RS). Plantas de arroz foram crescidas sob sistema hidropônico em sala de crescimento com temperatura e fotoperíodo controlados e submetidas aos tratamentos controle, toxidez de Al (150 μ M e 300 μ M de Al), deficiência de Fe (ausência de Fe) e toxidez de Al e deficiência de Fe combinados. Após a exposição aos diferentes tratamentos, foi realizada a coleta de amostras e análise das variáveis fisiológicas (biomassa fresca e seca, altura de plantas, variáveis morfológicas do sistema radicular, área foliar e número de folhas), bioquímicas (enzimas antioxidantes, conteúdo de peróxido de hidrogênio e pigmentos fotossintéticos) e moleculares (expressão dos genes *OsIRT1*, *OsYSL15*, *OsIRO2* por RT-qPCR). Foram observadas alterações esperadas em plantas das duas espécies submetidas a Al. Plantas sob deficiência de Fe apresentaram clorose das folhas mais jovens, como esperado. No entanto, a clorose foi revertida a níveis similares ao de plantas cultivadas sob condição controle tanto para *O. rufipogon* quanto *O. sativa* quando estas foram cultivadas sob deficiência de Fe e excesso de Al combinados. Também foi observado que os transportadores induzidos por deficiência de Fe, *OsIRT1* e *OsYSL15*, tiveram sua expressão em raízes suprimida pela presença de Al. O fator de transcrição que regula as respostas de deficiência de Fe, *OsIRO2*, no entanto, foi induzido por deficiência de Fe isoladamente em ambas as espécies, e não foi suprimido no tratamento combinado, indicando que o efeito de reversão do sintoma de deficiência de Fe dependente de Al atua em uma etapa posterior à indução de *OsIRO2*. Especula-se, portanto, que algum fator induzido por Al inibe os transportadores que estão abaixo na cascata de resposta à deficiência de Fe. Os resultados aqui obtidos sugerem pela primeira vez um mecanismo para efeitos benéficos do Al em plantas de arroz.

Palavras-chave: Arroz, Nutrição de Plantas, Ferro, Alumínio, Transportadores.

ABSTRACT

INTERACTION BETWEEN IRON DEFICIENCY AND ALUMINUM TOXICITY IN

Oryza rufipogon AND *Oryza sativa*

AUTHOR: Jover da Silva Alves

ADVISOR: Luciane Almeri Tabaldi

Rice is one of the most widely grown and consumed cereals in the world and is the staple food for more than half of the world's population. Due to its wide distribution of cultivation, rice cultivation is exposed to the most diverse climatic and environmental conditions and, consequently, to various abiotic stresses. Among the stresses to which rice is exposed is iron deficiency (Fe) and aluminum toxicity (Al), two major problems in world agriculture. In this context, the objective of the present work was to evaluate the response of wild rice species *Oryza rufipogon* and cultivated species *Oryza sativa* cultivar IRGA 429 submitted to Fe deficiency and Al toxicity regarding physiological and biochemical variables, and gene expression under Fe deficiency and Al toxicity. The experiments were carried out at the Plant Physiology Laboratory of Agrobiological Interest of the Federal University of Santa Maria (UFSM), in Santa Maria (RS). Rice plants were grown under hydroponic system in growth room with controlled temperature and photoperiod and submitted to nutrient solution containing the treatments: control solution, Al toxicity (150 μ M and 300 μ M Al), Fe deficiency (absence of Fe) and Al toxicity allied to Fe deficiency. After exposure to the different treatments, physiological (fresh and dry biomass, plant height, root system morphological parameters, leaf area and leaf number) biochemical (antioxidant enzymes, hydrogen peroxide content and photosynthetic pigments) and molecular variables (expression of OsIRT1, OsYSL15, OsIRO2 genes by RT-qPCR) were collected and analyzed. Expected changes were observed in plants of the two species submitted to Al. Plants under Fe deficiency showed younger leaf chlorosis, as expected. However, chlorosis was reverted to levels similar to plants grown under control conditions for both *O. rufipogon* and *O. sativa* when they were grown under combined Fe deficiency and Al excess. It was also observed that Fe deficiency-induced transporters, OsIRT1 and OsYSL15, had their root expression suppressed by the presence of Al. The transcription factor that regulates Fe deficiency responses, OsIRO2, however, was induced by Fe deficiency alone in both species, and was not suppressed in the combined treatment, indicating that the reversal effect of Al-dependent Fe deficiency symptom acts at a later stage than OsIRO2 induction. It is speculated, therefore, that some Al-induced factor inhibits carriers below the Fe deficiency response cascade. The results obtained here suggest for the first time a mechanism for beneficial effects of Al on rice plants.

Keywords: Rice, Plants Nutrition, Iron, Aluminium, Transporter.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Área foliar (a; b), altura de colmo (c; d) e massa seca de parte aérea (e; f) de plantas de <i>Oryza rufipogon</i> e <i>Oryza sativa</i> cultivar IRGA 429 submetidas à deficiência de Fe e toxidez por Al.	28
Figura 2	Massa seca de raízes (a; b), comprimento do sistema radicular (c; d) e volume radicular (e;f) de plantas de <i>Oryza rufipogon</i> e <i>Oryza sativa</i> cultivar IRGA 429 submetidas à deficiência de Fe e toxidez por Al.....	29
Figura 3	Área projetada da raiz (a; b), diâmetro médio de raízes (c; d) e número de ramificações (e; f) das raízes de plantas de <i>Oryza rufipogon</i> e <i>Oryza sativa</i> cultivar IRGA 429 submetidas à deficiência de Fe e toxidez por Al.....	30
Figura 4	Comparação de plantas de <i>Oryza rufipogon</i> e <i>Oryza sativa</i> cultivar IRGA 429 submetidas à deficiência de Fe e toxidez por Al aos 21 dias de tratamento.	31
Figura 5	Concentração de Al (a; b; c; d) e Fe (e; f; g; h) em tecidos de folhas e raízes de <i>Oryza rufipogon</i> e <i>Oryza sativa</i> cultivar IRGA 429 submetidas à deficiência de Fe e toxidez por Al aos 21 dias de tratamento.	32
Figura 6	Concentração de Zn (a; b; c; d) e Cu (e; f; g; h) em tecidos de folhas e raízes de <i>Oryza rufipogon</i> e <i>Oryza sativa</i> cultivar IRGA 429 submetidas à deficiência de Fe e toxidez por Al aos 21 dias de tratamento.	34
Figura 7	Concentração de Mn (a; b; c; d) e a razão entre a concentração de Fe:Zn (e; f; g; h) em tecidos de folhas e raízes de <i>Oryza rufipogon</i> e <i>Oryza sativa</i> cultivar IRGA 429 submetidas à deficiência de Fe e toxidez por Al aos 21 dias de tratamento.	35
Figura 8	Concentração de clorofila a (a; b), clorofila b (c; d); clorofila total (e; f) e carotenoides (g; h) em folhas de plantas de <i>Oryza rufipogon</i> e <i>Oryza sativa</i> cultivar IRGA 429 submetidas à deficiência de Fe e toxidez por Al.....	37
Figura 9	Comparação de plantas de <i>Oryza rufipogon</i> e <i>Oryza sativa</i> cultivar IRGA 429 submetidas à deficiência de Fe e toxidez por Al aos 21 dias de tratamento.	38
Figura 10	Atividade da enzima Guaiacol Peroxidase (POD) em folhas (a; b) e raízes (c; d) de plantas de <i>Oryza rufipogon</i> e <i>Oryza sativa</i> cultivar IRGA 429 submetidas à deficiência de Fe e toxidez por Al.	39
Figura 11	Concentração de Peróxido de Hidrogênio em folhas (a; b) e raízes (c; d) de plantas de <i>Oryza rufipogon</i> e <i>Oryza sativa</i> cultivar IRGA 429 submetidas à deficiência de Fe e toxidez por Al.	40
Figura 12	Expressão relativa de OsIRO2 (a; b), OsYSL15 (c; d) e OsIRT1 (e; f) de raízes de <i>Oryza rufipogon</i> e <i>Oryza sativa</i> IRGA 429 aos 10 dias de tratamento.	42
Figura 13	Modelo proposto de regulação de repostas à interação entre deficiência de Fe e toxidez por Al em arroz.	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Al	Alumínio
Fe	Ferro
OMS	Organização mundial da saúde
ONU	Organização das nações unidas
EROs	Espécies reativas de oxigênio
AOs	Ácidos orgânicos
ABC	<i>ATP-binding cassette</i>
ASR	Ácido abscísico, estresse e maturação
YSL	<i>Yellow stripe</i>
IRT1	<i>Iron-regulated transporter</i>
Nramp	<i>Natural resistance associated macrophage protein</i>
FRD	<i>Reductase defective ferric</i>
PSI	Fotossistema I
PSII	Fotossistema II
MATE	<i>Multidrug and toxic compound extrusion</i>
POD	Guaiacol peroxidase
SOD	Superóxido dismutase
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
Cu	Cobre
Zn	Zinco
Mn	Manganês
Fe:Zn	Relação Ferro/Zinco
RNA	Ácido ribonucleico
DNA	Ácido desoxirribonucleico
cDNA	DNA complementar
RT-qPCR	PCR em tempo real quantitativo com transcrição reversa (<i>Real Time Quantitative Reverse Transcription PCR</i>)
UBQ5	<i>Ubiquitin 5</i>
Anova	Análise de variância
OsIRO2	Iron-related transcription factor 2
QTL	<i>Quantitative Trait Loci</i>
Si	Silício
PSs	Fitosideróforos
bHLH	<i>Basic helix-loop-helix</i>
IDEF1	<i>Iron deficiency-responsive element 1</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. OBJETIVOS.....	13
2.1. OBJETIVO GERAL.....	13
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	13
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
3.1. A CULTURA DO ARROZ.....	14
3.2. TOXIDEZ POR ALUMÍNIO.....	15
3.3. FERRO NO COMPLEXO SOLO-PLANTA.....	17
3.4. INTERAÇÃO DA DEFICIÊNCIA DE FERRO E TOXIDEZ POR ALUMÍNIO.....	19
4. ARTIGO - INTERAÇÃO ENTRE A DEFICIÊNCIA DE FERRO E TOXIDEZ POR ALUMÍNIO EM <i>Oryza rufipogon</i> E <i>Oryza sativa</i>	21
4.1. INTRODUÇÃO.....	21
4.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	22
4.2.1 Material vegetal e condições de crescimento.....	22
4.2.2 Produção de matéria seca.....	23
4.2.3 Avaliações biométricas de raízes e área foliar.....	23
4.2.4 Determinação das variáveis bioquímicas.....	24
4.2.5 Concentração de elementos minerais nos tecidos.....	24
4.2.6 Análises de expressão gênica por RT – qPCR.....	24
4.2.7 Análise Estatística.....	25
4.3. RESULTADOS.....	25
4.4. DISCUSSÃO.....	43
4.5. CONCLUSÃO.....	50
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50

1. INTRODUÇÃO

O arroz (*Oryza sativa* L.) é um dos cereais mais importantes e cultivados no mundo, sendo um dos principais fornecedores de calorias para a população humana. Em virtude da cultura do arroz compor a base da pirâmide alimentar, o cereal deve ser consumido em maior quantidade. Portanto, é considerado um dos alimentos com maior potencial para o combate à fome no mundo (EMBRAPA, 2002).

No Brasil, a safra de 2018/2019 produziu 12 milhões de toneladas (CONAB, 2019), o que torna o país o maior produtor fora do continente asiático (FAO, 2013), ocupando uma posição de destaque na perspectiva socioeconômica em relação às demais culturas anualmente cultivadas (SOSBAI, 2014). O arroz é cultivado em todo o território brasileiro, no entanto, a região Sul se destaca das demais regiões em termos de produtividade, onde o Rio Grande do Sul (RS) cultivou uma área de aproximadamente 984.081 ha, com uma produção de 8.474.392 toneladas do grão na safra de 2018/19 (IRGA, 2019).

A espécie de arroz selvagem *Oryza rugipogon*, nativa do Sul da Ásia, é o ancestral do arroz domesticado *Oryza sativa*, o qual é uma das culturas mais amplamente cultivadas no mundo (OKA, 1988; CHENG et al.; 2003). O arroz pode ser cultivado em uma ampla diversidade de condições climáticas e ambientais. Assim, as plantas de arroz são expostas a diversos estresses bióticos e abióticos, os quais podem comprometer o rendimento dos grãos. Para atender à demanda, é necessário que o arroz seja capaz de manter a produtividade para responder a esses estresses sem comprometer a colheita (ALMEIDA et al., 2016; RAHMAN et al., 2019).

No cultivo orizícola, perdas na produtividade das lavouras ocorrem em virtude das características físicas e químicas do solo. As principais características químicas do solo que influenciam negativamente a produtividade são as deficiências nutricionais e a presença de elementos tóxicos às plantas. A interação entre a presença de elementos fitotóxicos com a deficiência de nutrientes é um campo de estudos complexo no qual ainda há muito para ser explorado. Ademais, é uma área que pode proporcionar grandes aumentos no rendimento das culturas agrícolas.

De maneira geral, os solos brasileiros são naturalmente ácidos e com a presença de alumínio (Al) na sua forma trivalente (Al^{3+}). O Al trocável é tóxico para a maioria dos vegetais, sendo que a manifestação dessa toxidez é marcada pela inibição do crescimento radicular após uma breve exposição das raízes às soluções com concentrações micromolares de Al (SCHIMITT et al., 2016; YAMAMOTO, 2019).

Um dos elementos essenciais para o desenvolvimento das plantas é o ferro (Fe), além de ser essencial à nutrição humana. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2014), a deficiência de micronutrientes na alimentação afeta aproximadamente 2 bilhões de pessoas no mundo, especialmente nos países subdesenvolvidos. Além disso, a carência de Fe é uma causa frequente de desnutrição e anemia (WHO, 2008). O arroz é uma planta com altos requerimentos de Fe, e no cultivo em sequeiro sua ausência é limitante para a produção de grãos e biomassa (TAKAHASHI et al., 2001). Após a absorção pelas raízes, o Fe pode ser transportado via xilema para os órgãos aéreos e remobilizado pelo floema entre os órgãos (BRIAT et al., 2007; LUCENA; HERNANDEZ-APAOLAZA, 2017). No entanto, é de grande importância o estudo dos transportadores de Fe, para que o nutriente chegue até o grão e seja disponibilizado para a alimentação humana.

Sabe-se que é crescente a demanda por alimentos de melhor qualidade e em maior quantidade. Nesse sentido, a deficiência de Fe e a toxidez de Al são dois principais fatores limitantes à produtividade de lavouras, e estão presentes na maioria dos solos brasileiros. No entanto, não se conhece ao certo a interação entre a toxidez por Al e a deficiência de Fe, e a dinâmica dos genes responsáveis por tais respostas. Desta maneira, a dinâmica desses dois fatores no arroz selvagem e domesticado se faz importante na elucidação da fisiologia da cultura, e na busca de genótipos mais adaptados ao crescimento nestas condições.

2. OBJETIVOS

2.1.OBJETIVO GERAL

Compreender a interação entre a resposta à deficiência de Fe e toxidez de Al em plantas de *Oryza rufipogon* e *Oryza sativa*.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar se a interação entre a deficiência de Fe e excesso de Al afeta o crescimento da parte aérea e a morfologia do sistema radicular de plantas de *Oryza rufipogon* e *Oryza sativa* cultivar IRGA 429.
- Caracterizar as respostas bioquímicas através do conteúdo de clorofila *a*, clorofila *b* e carotenoides de folhas, atividade da enzima peroxidase, e o conteúdo de peróxido de

hidrogênio de plantas de *Oryza rufipogon* e *Oryza sativa* cultivar IRGA 429 expostas à deficiência de Fe, excesso por Al e deficiência de Fe e excesso de Al;

- Verificar se a interação entre deficiência de Fe e excesso por Al afeta a expressão dos genes *OsIRT1*, *OsYSL15*, *OsIRO2* em folhas e raízes de plantas de *Oryza rufipogon* e *Oryza sativa* cultivar IRGA 429;

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. A CULTURA DO ARROZ

O arroz cultivado (*Oryza sativa* L.) possui um papel essencial na agricultura mundial. A história da sua domesticação provém do seu ancestral selvagem, *Oryza rufipogon*, o qual foi domesticado pelo menos duas vezes por diferentes populações, originando as duas maiores variedades de arroz, *Oryza sativa* subespécie *indica*, a qual foi domesticada no leste da Índia, e *Oryza sativa* subespécie *japonica*, domesticada no sul da China (LONDO et al., 2006).

O arroz constitui um dos alimentos mais importantes para a nutrição humana, estando entre os cereais mais produzidos e consumidos no mundo, caracterizando-se como o alimento principal para mais da metade da população mundial (FAO, 2015). Ocupando o segundo lugar como cereal mais cultivado no mundo, o arroz abrange uma área aproximada de 166 milhões de hectares, com produção de 741 milhões de toneladas de grãos em casca, correspondendo a 29% do total de grãos destinados à alimentação humana (SOSBAI, 2016).

Segundo a Organização das Nações Unidas (ONU), a população mundial aumentará para 8 bilhões em 2025 (KHUSH, 2005). Em função do aumento demográfico, deverá haver um aumento de 40% na produção de arroz até 2030 para atender a demanda dos países consumidores do cereal. Para que esse aumento ocorra, serão necessárias estratégias de obtenção e aquisição de variedades com maior rendimento (KHUSH, 2005).

O Brasil é um dos maiores produtores de arroz do mundo, onde o estado do Rio Grande do Sul representa cerca de 2/3 do montante, caracterizando-se como o maior produtor de arroz irrigado, com aproximadamente 68% da produção nacional (CONAB, 2017). Difundido largamente no país, o arroz é consumido por todas as classes sociais, principalmente pelas de menor renda. O arroz ocupa posição de destaque do ponto de vista econômico e social, sendo responsável por suprir a população brasileira com um considerável aporte de calorias e proteínas na sua dieta básica (NEPA, 2011).

3.2. TOXIDEZ POR ALUMÍNIO

O Al é o terceiro elemento químico mais abundante da crosta terrestre, sendo que o mesmo se encontra na forma de minerais secundários que dão origem aos solos (MIGUEL et al., 2010). Em solos com valores de pH acima de 5,5, o Al encontra-se presente nos minerais primários e secundários. No entanto, em valores de pH inferiores a 5,5, o íon Al^{3+} predomina na solução do solo e causa toxidez no sistema radicular (KOCHIAN et al., 2015).

A toxidez por Al em solos ácidos é uma das limitações mais significativas para a produção de culturas em todo o mundo, tendo em vista que aproximadamente 50% dos solos cultiváveis do mundo são ácidos (KOCHIAN et al., 2015). Os países em desenvolvimento estão localizados onde se encontram a maioria dos solos ácidos, assim sendo, a toxidez por Al limita a produção vegetal em localidades onde a segurança alimentar é mais tênue (VON UEXKULL; MUTERT, 1995; PANDA et al., 2009).

O potencial da toxidez por Al resulta de complexas interações do elemento com a parede celular, membrana plasmática e citosol das células vegetais (KOCHIAN et al., 2015). A primeira interação entre o Al e a planta ocorre no processo de absorção do elemento pelo sistema radicular (SCHMITT et al., 2016). O Al ao entrar em contato com a raiz, liga-se à parede celular da rizoderme e córtex externo, desse modo, o primeiro dano causado pelo Al ocorre já na parede celular (KOPITTKKE et al., 2015). Após alguns minutos de exposição ao Al a permeabilidade da membrana plasmática das células das raízes começa a ser afetada, o que pode ser atribuído à capacidade do Al de ligar-se a grupos fosfatos da membrana (SILVA et al., 2012).

A toxidez por Al limita o crescimento e desenvolvimento das culturas através da redução do crescimento radicular (KOPITTKKE et al., 2015). A exposição do sistema radicular ao Al provoca desregulação do ciclo celular e atividade mitótica reduzida, inibindo o alongamento ou a divisão celular (SILVA, 2012). Há relatos de que a exposição ao Al causa danos no citoesqueleto, perturbando a organização de microtúbulos e microfilamentos das células radiculares (ALESSA; OLIVEIRA, 2001; FRANTZIOS et al., 2001; GUO et al., 2017).

Raízes de plantas sob estresse de Al tornam-se atrofiadas, quebradiças e aumentam a espessura da parede celular, tornando as raízes ineficientes na absorção de nutrientes e água, além de sofrerem alterações em transportadores de membrana (GUO et al., 2012; HE et al., 2015; KOPITTKKE et al., 2016), uma vez que a membrana é despolarizada e afeta o transporte de íons e outros processos celulares (BOSE et al., 2011). Outro efeito deletério do Al é a indução da formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) (CHOWRA et al., 2017) como

superóxido, radical hidroxila e peróxido de hidrogênio, os quais podem ser removidos das células por enzimas antioxidantes (superóxido dismutase, peroxidases, catalase e glutathione redutase, entre outras) e compostos antioxidantes de baixo peso molecular como ácido ascórbico, glutathione, compostos fenólicos, flavonoides e carotenoides (LEE et al., 2007; DABROWSKA et al., 2007; CHOUDHURY et al., 2016).

As ERO quando geradas em um nível ideal servem como moléculas de sinalização, contribuindo com o crescimento e defesa da planta. Contudo, quando produzidas em excesso, como é o caso em situações de estresse causados pela toxidez do Al, afetam negativamente o metabolismo celular (GUPTA et al., 2013). O estresse oxidativo gerado pelas ERO induz a peroxidação de lipídeos de membrana, danos no DNA, a desnaturação de proteínas, oxidação de lipídeos e proteínas, diminuição da atividade enzimática e, em casos mais severos, podem resultar em morte celular programada (SINGH et al., 2017).

No entanto, plantas tolerantes são capazes de se desenvolver na presença de Al³⁺ através de estratégias de tolerância ou exclusão do elemento. Dois tipos principais de mecanismos de resistência ao Al são relatados na literatura: exclusão do Al, que impede a entrada do metal no ápice da raiz; e tolerância ao Al, em que o metal entra na planta e é sequestrado/detoxificado nos vacúolos (KOCHIAN et al., 2015).

Um dos mecanismos desenvolvidos pelas plantas para suprimir o efeito tóxico do Al é a secreção de substâncias quelantes, como os ácidos orgânicos (AOs), sobretudo malato, citrato e oxalato (FAN et al., 2016; YANG et al., 2019). Os AOs são relatados como ânions desprotonados localizados no citosol, que no início do estresse pelo Al, são secretados para a rizosfera, quelando o Al³⁺ tóxico e formando um complexo estável e que não é absorvido pelas raízes (SINGH et al., 2017).

A tolerância ao Al envolve uma intensa regulação da expressão gênica. O Al induz a expressão de uma série de genes de tolerância ao Al associados a diferentes mecanismos (KOCHIAN et al., 2015), tais como *STAR1* e *ASR5*. As proteínas *STAR1* juntamente com *STAR2* formam um complexo que funciona como um transportador do tipo *ATP-binding cassette* (ABC), o qual é necessário para a detoxificação de Al na cultura do arroz (MA et al., 2005). O transportador ABC transporta uridina difosfato glicose (UDP-glicose), que pode ser usado para modificar a parede celular (HUANG et al., 2009).

As proteínas *ASR* (*Abscisic acid, stress and ripening*) constituem uma família de proteínas específicas de plantas que estão envolvidas com o estresse biótico e abiótico (KIM et al., 2009; LIU et al., 2010). A proteína *ASR5* é encontrada no cloroplasto, citoplasma e no núcleo (ARENHART et al., 2012) e tem seus níveis de transcrição aumentados em plantas

expostas ao Al, enquanto que plantas com *ASR5* silenciado são sensíveis ao Al (ARENHART et al., 2013). Essa proteína regula um vasto número de genes responsivos ao Al, entre eles o *STAR1* (ARENHART et al., 2014).

3.3. FERRO NO COMPLEXO SOLO-PLANTA

Com um importante papel na litosfera, o Fe é o segundo metal mais abundante no solo (ZINDER et al., 1996), compondo cerca de 5,1% da massa da crosta terrestre (DONG et al., 2009). Nos solos, o Fe pode ser encontrado na forma divalente Fe^{2+} , a qual pode sofrer oxidação originando Fe^{3+} . Em função da baixa solubilidade dos óxidos de Fe^{3+} , os mesmos ficam acumulados nos solos (FILHO, 1994). O metal pode ser absorvido pelas raízes tanto na forma de Fe^{2+} como de Fe^{3+} , porém, é absorvido preferencialmente em sua forma reduzida (Fe^{2+}) (BROADLEY et al., 2012), a qual predomina em solos alagados, onde o potencial redox do solo é baixo (VELLOSO et al., 1993) e as condições são redutoras. Nesse caso, o Fe^{3+} é reduzido a Fe^{2+} , resultando em uma maior solubilidade do elemento (PONNAMPERUMA, 1975). Em solos com pH na faixa de 7,4 à 8,5 os minerais que contém Fe apresentam baixa solubilidade e uma lenta cinética de dissolução (LUCENA; HERNANDEZ-APAOLAZA, 2017).

Para suprimir a baixa disponibilidade de Fe, plantas superiores desenvolveram diferentes estratégias para aumentar a eficiência de absorção. Romheld; Marschner (1986) separaram esses mecanismos em dois tipos: Estratégia I, presente em plantas não-gramíneas; e Estratégia II, presente em gramíneas. Os processos utilizados pela Estratégia I, baseiam-se na redução de Fe^{3+} a Fe^{2+} antes de ser transportado para dentro da célula pelos transportadores *FRO2* (*ferric-chelate reductase oxidase*) (ROBINSON et al., 1999) e *IRT1* (*iron-regulated transporter gene*) (EIDE et al., 1996). Essa via permite a absorção de Fe^{3+} da raiz através da redução de quelatos de Fe^{2+} aliado ao aumento da biossíntese de transportadores de Fe^{2+} , acidificação da rizosfera e absorção dos íons ferrosos gerados através da membrana plasmática da raiz (ROBINSON et al., 1999; KOBAYASHI; NISHIZAWA, 2012; LUCENA; HERNANDEZ-APAOLAZA, 2017). Outra resposta relacionada à Estratégia I é a secreção de compostos fenólicos e prótons para a rizosfera, os quais auxiliam no aumento da solubilidade de íons férricos e na capacidade de redução de Fe na superfície da raiz (SANTI; SCHMIDT, 2009).

O mecanismo de resposta da Estratégia II é específico da família *Poaceae*, e se baseia na quelação de Fe^{3+} , vinculado à biossíntese e secreção de fitosideróforos na rizosfera, afim de

aumentar a absorção de Fe (HIND; GUERINOT, 2012). Moléculas de fitosideróforos ligam-se ao Fe^{3+} e proteínas transportadoras específicas da membrana plasmática transportam os complexos de Fe^{3+} -fitosideróforos para dentro da célula (BASHIR et al., 2006; UENO et al., 2007).

Embora o arroz seja uma planta de Estratégia II, baseada na absorção de Fe^{3+} através do transportador OsYSL15 (*yellow stripe 1-like*) (INOUE et al., 2009), o mesmo possui o transportador de Fe^{2+} OsIRT1 (*iron-regulated transporter*), permitindo também a absorção de Fe^{2+} (ISHIMARU et al., 2006). Os transportadores IRT encontram-se na membrana plasmática, e membros dessas famílias de transportadores são relatados como responsáveis pela absorção de metais essenciais na rizosfera (PEDAS et al., 2008; CALLIATTE et al., 2010).

Em função de sua baixa solubilidade e alta reatividade, o Fe para ser translocado precisa estar associado com moléculas quelantes e com seu estado redox apropriado entre sua forma ferrosa e férrica (HELL, 2003). O citrato, nicotianamina e fitosideróforos da família do ácido mugineico são descritos como os principais quelantes de Fe na translocação do metal dentro da planta (KOBAYASHI; NISHIZAWA, 2012). No arroz, após a absorção radicular, o Fe é transportado radialmente através da raiz até o xilema. No xilema o Fe pode ser quelado por citrato para ser transportado. Já para a translocação do Fe entre órgãos da planta, a nicotianamina é relatada como o agente quelante (LUCENA; HERNANDEZ-APAOLAZA, 2017). Alguns membros da família FRD (*reductase defective ferric*), os quais pertencem ao grupo de transportadores de citrato (YOKOSHO et al., 2010), têm sido caracterizados pela função na homeostase do Fe. Em *Arabidopsis*, FRD3 foi caracterizado como transportador membro da família de proteínas *MATE* (*multi drug and toxic compound extrusion*) que facilita o efluxo de citrato no xilema (DURRETT et al., 2007). Mutantes de FRD3 em *Arabidopsis* exibem clorose associada à deficiência de Fe (ROGERS; GUERINOT, 2002). Em arroz, o transportador OsFRDL1 está envolvido na translocação eficiente do Fe das raízes para a parte aérea no arroz, sendo responsável por secretar citrato para o xilema, permitindo a translocação de Fe quelado a citrato (YOKOSHO et al., 2009).

A expressão de genes que codificam enzimas biossintetizantes necessárias para a produção de fitosideróforos, além de transportadores que aumentam a absorção, solubilidade e translocação do elemento é induzida em deficiência de Fe em *Arabidopsis* e arroz (KOBAYASHI; NISHIZAWA, 2012; LUCENA; HERNANDEZ-APAOLAZA, 2017), maximizando a eficiência na utilização do Fe. Na planta, a homeostase do Fe é essencial para eficiência da fotossíntese. Um teor insuficiente de Fe altera a síntese e estrutura dos cloroplastos e perturba o transporte de elétrons entre o PSII (fotossistema II) e o PSI (fotossistema I)

(EBERHARD et al., 2008). O conteúdo de proteínas dos componentes do transporte de elétrons, bem como o complexo citocromo-*6-f* decrescem em situações onde o Fe é insuficiente. No arroz, o núcleo do PSI e proteínas do LHC1, como a Lhca1 e Lhca4, são usadas para mensurar a degradação da subunidade do PSI em função da deficiência de Fe (YADAVALLI et al., 2012).

Além de ser constituinte de sistemas enzimáticos essenciais para a fotossíntese, o Fe participa da formação de algumas enzimas, como a catalase e peroxidase, e em processos metabólicos como fixação simbiótica do nitrogênio e redução de nitrato e sulfato (MOTTA et al., 2007). Ademais, o Fe é relatado como um fator limitante para a produção de biomassa e de sementes em espécies como a *Arabidopsis thaliana* (RAVET et al., 2009; RAVET et al., 2012) e *Oryza sativa* (TAKAHASHI et al., 2001).

Assim como para o metabolismo vegetal, o Fe é um elemento essencial para a alimentação humana. A principal função biológica do Fe em animais é o transporte de oxigênio, uma vez que é constituinte de proteínas do grupo hemoglobina e mioglobina (SKIKNE; HERSHKO, 2012). Além disso, o Fe é essencial para outras funções metabólicas relacionadas ao crescimento, atividade muscular, imunidade, força óssea e sistema nervoso (BLANCO-ROJO; VAQUERO, 2019)

A deficiência de Fe na dieta humana é a desordem nutricional mais recorrente ao redor do mundo, e, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2016), 30% da população mundial é afetada. No ano de 2011, cerca de 800 milhões de crianças e mulheres foram diagnosticadas anêmicas em decorrência da carência de Fe (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2015). Nesse contexto, a biofortificação é considerada a alternativa que apresenta melhor relação custo-benefício e maior eficiência para aumentar o fornecimento de Fe (PRENTICE et al., 2017).

3.4.INTERAÇÃO DA DEFICIÊNCIA DE FERRO E TOXIDEZ POR ALUMÍNIO

O genoma do arroz possui ao menos 40 genes da família de proteínas MATE (YOKOSHO et al., 2009). Essas proteínas estão presentes em bactérias, fungos, plantas e mamíferos (OMOTE et al., 2006). Uma das funções dos genes dessa família é o transporte de ácidos orgânicos, como o citrato, em resposta à toxidez por Al (MAGALHAES, 2010). O gene OsFRDL1, membro dessa família, é um transportador de citrato necessário para a translocação eficiente de Fe sob deficiência (YOKOSHO et al., 2009). Esse grupo de transportadores está envolvido pelo carregamento de citrato nos vasos do xilema (YOKOSHO et al., 2010), onde o citrato forma complexos com Fe, facilitando a translocação do metal das raízes para a parte

aérea (YOKOSHO et al., 2011). No amendoim, o transportador AhFRDL1 está envolvido tanto na tolerância à toxidez por Al quanto à deficiência de Fe (QIU et al., 2019).

Por desempenhar várias funções ligadas ao crescimento e metabolismo da planta, a deficiência de Fe afeta o crescimento radicular. De maneira similar, o principal efeito nocivo da toxidez por Al às plantas é a redução do crescimento radicular, por reduzir o alongamento ou a divisão celular (MACÊDO et al., 2009), tornando as raízes ineficientes na absorção de nutrientes e água (KOCHIAN et al., 2004).

A presença de Fe na solução do solo acarreta um aumento do pH da rizosfera do arroz em função da redução e oxidação do Fe como consequência da liberação de O₂ (HISINGER, 2003). Em casos de deficiência de Fe, algumas plantas respondem com uma maior capacidade de acidificação da rizosfera por suas raízes, através da liberação de H⁺ (MARSCHNER; RÖMHELD, 1994). Essa acidificação da rizosfera é uma estratégia das plantas para aliviar a restrição de Fe (HISINGER et al., 2003). Além disso, a expressão de genes como o OsIRT1, induzidos pela deficiência de Fe, é considerada uma via importante para o acúmulo de metais nocivos (KOCHIAN et al., 2015).

4. ARTIGO - INTERAÇÃO ENTRE A DEFICIÊNCIA DE FERRO E TOXIDAZ POR ALUMÍNIO EM *Oryza rufipogon* E *Oryza sativa*

4.1. INTRODUÇÃO

O arroz (*Oryza sativa* L.) é um dos cereais mais cultivados e consumido ao redor do mundo, considerado alimento base para mais da metade da população mundial (FAO, 2015). Por ser um dos principais alimentos fornecedores de calorias, compõe a base da pirâmide alimentar, além de ser apontado como um dos alimentos com alto potencial para a combate à fome no mundo (EMBRAPA, 2002). O Brasil é o maior produtor mundial fora do continente asiático, com uma produção de aproximadamente 13 milhões de toneladas anuais (FAO, 2013). No cenário nacional, a região Sul destaca-se das demais regiões, com o estado do Rio Grande do Sul sendo responsável por cerca de 61% do total da produção brasileira de arroz (IRGA, 2017).

O arroz cultivado (*O. sativa*) foi domesticado através do seu ancestral *O. rufipogon*, nativo do Sul da Ásia (OKA, 1988; CHENG et al.; 2003). Por ser cultivado em todos os continentes, as áreas de cultivo de arroz possuem ampla variação de características ambientais, climáticas e agronômicas e, conseqüentemente, o arroz é exposto a diversos estresses abióticos, tais como baixos teores de elementos essenciais na solução do solo e a presença de elementos tóxicos.

No metabolismo vegetal, a homeostase do Fe é essencial para maior eficiência da fotossíntese. O Fe é constituinte de sistemas enzimáticos essenciais para a fotossíntese, assim sendo, teores insuficientes de Fe alteram a síntese dos cloroplastos, perturbando o transporte de elétrons entre os fotossistemas (EBERHARD et al., 2008). Além do mais, o Fe participa da formação de algumas enzimas como catalase, peroxidase, fixação biológica de nitrogênio e redução de nitrato e sulfato (MOTTA et al., 2007).

Além da deficiência de Fe, o arroz de sequeiro quando cultivado em solos ácidos é exposto à presença de Al na solução do solo. Os solos brasileiros são naturalmente ácidos e com ocorrência de teores elevados de Al (CUNHA et al., 2014) e a presença de Al^{+3} é um dos principais limitantes da produção agrícola. Os íons de Al afetam o meristema apical das raízes levando à inibição do alongamento celular e, em casos mais severos, à morte celular. O Al também é relatado como agente indutor da formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), as quais afetam negativamente o metabolismo celular (GUPTA et al., 2013).

Entretanto, algumas espécies vegetais desenvolveram mecanismos de resistência ao Al baseados em estratégias de convivência ou exclusão do elemento. Em casos de exclusão do Al, o elemento é impedido de entrar no ápice da raiz, enquanto em casos de tolerância o Al entra na planta e é sequestrado/detoxificado (KOCHIAN et al., 2015). Tais mecanismos de tolerância requerem uma intensa regulação da expressão gênica. O Al induz a expressão de uma série de genes de tolerância ao Al associados a diferentes mecanismos, como o STAR1 e ASR5 (ARENHART et al., 2013).

Nesse contexto, os mecanismos de tolerância e de resposta à toxidez ao Al, bem como o estudo dos transportadores de Fe, para que o nutriente chegue até o grão e seja disponibilizado para a alimentação humana (KOCHIAN et al., 2004; 2015), são questões importantes no campo da fisiologia vegetal. Desta maneira, a dinâmica desses dois fatores no arroz selvagem e domesticado se faz importante na elucidação da fisiologia da cultura, e na busca de genótipos mais adaptados ao crescimento nestas condições.

Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar as respostas fisiológicas e bioquímicas em plantas de arroz selvagem *Oryza rufipogon*, e do arroz cultivado *Oryza sativa* cultivar IRGA 429, cultivados em deficiência de Fe e toxidez de Al, bem como a expressão dos genes envolvidos na deficiência de Fe e toxidez de Al para avaliar a interação entre a resposta desses dois estresses.

4.2.MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Material vegetal e condições de crescimento

Os experimentos foram realizados em sala de crescimento controlada sob sistema hidropônico. Foram utilizadas sementes de *Oryza rufipogon* (BRA 00004909-8) e *Oryza sativa* cultivar IRGA 429. As sementes foram submetidas a assepsia com água destilada, hipoclorito de sódio e detergente neutro 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 cultivadas em recipientes plásticos com capacidade de dois litros em solução (controle) conforme descrita por Ricachenevsky et al. (2011), pelo período de nove dias para aclimação.

Posteriormente, as plantas foram submetidas aos tratamentos contendo solução nutritiva na condição controle, toxidez de Al (150 e 300 μ M), deficiência de Fe e a interação entre a toxidez de Al e a deficiência de Fe:

- a) Solução controle: 0,1mM KCl; 0,1mM KH₂PO₄; 2mM Ca(NO₃); 0,5mM MgSO₄; 1,4mM K₂SO₄; 0,1mM Fe-EDTA; 0,5 μ M ZnSO₄; 10 μ M H₃BO₃; 0,2 μ M CuSO₄; 0,01 μ M (NH₄)₆ Mo₇O₂₄; 0,5 μ M MnSO₄.
- b) Solução com 150 μ M de Al: Solução controle acrescida de 150 μ M AlCl₃.
- c) Solução com 300 μ M de Al: Solução controle acrescida de 300 μ M AlCl₃.
- d) Solução com deficiência de Fe: Solução controle sem adição de Fe-EDTA.
- e) Solução com 150 μ M de Al e deficiência de Fe: Solução controle sem adição de Fe-EDTA acrescida de 150 μ M AlCl₃.
- f) Solução com 300 μ M de Al e deficiência de Fe: Solução controle sem adição de Fe-EDTA acrescida de 300 μ M AlCl₃.

A cada três dias foram realizadas as trocas da solução nutritiva e o pH foi ajustado para 4,5 com adição de HCl ou NaOH.

4.2.2 Produção de matéria seca

Após 21 dias do início dos tratamentos, a parte aérea e raízes de cinco plantas de cada espécie por tratamento foram coletadas e secas em estufa de ventilação forçada a 65°C até atingir massa constante. A matéria seca foi determinada com o uso de uma balança de precisão.

4.2.3 Avaliações biométricas de raízes e área foliar

A coleta das plantas foi realizada aos 21 dias após o início dos tratamentos. Para as avaliações biométricas de raízes utilizaram-se raízes de cinco plantas de cada espécie por tratamento. Foram avaliadas as variáveis comprimento do sistema radicular (cm planta⁻¹), diâmetro médio de raízes (mm planta⁻¹), volume de raízes (cm³ planta⁻¹), área projetada do sistema radicular (cm² planta⁻¹) e número de ramificações. Para a área foliar foi utilizado cinco plantas de cada espécie 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.

4.2.4 Determinação das variáveis bioquímicas

Aos 21 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 7 plantas, totalizando quatro repetições por espécie em cada tratamento. As amostras foram maceradas em nitrogênio líquido e posteriormente foi mensurado a atividade da enzima guaiacol peroxidase, e a concentração de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e de pigmentos fotossintéticos.

Para a atividade da enzima guaiacol peroxidase, amostras frescas de raízes e folhas das plantas foram usadas. A atividade das peroxidases não específicas presentes no extrato foi determinada segundo Zeraik et al. (2008), utilizando-se o guaiacol como substrato. A concentração de peróxido de hidrogênio foi determinada de acordo com Loreto; Velikova (2001), e foi expressa como $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ g}^{-1}$. O conteúdo de clorofila *a*, clorofila *b* e carotenoides de folhas foi mensurado segundo o método de Hiscox; Israelstan (1979) e estimados usando a equação de Lichtenthaler (1987).

4.2.5 Concentração de elementos minerais nos tecidos

Após 21 dias de exposição aos tratamentos, cinco plantas por tratamento foram coletadas e separadas em raízes e folhas. O material foi submetido à estufa de ar forçado a 65°C até atingirem peso constante e posteriormente macerado. As análises foram realizadas no Laboratório de Química e Fertilidade do Solo da UFSM. As amostras secas de tecidos de raízes e folhas foram submetidas à digestão nitroperclórica (HNO₃-HClO₄) (EMBRAPA, 1997). Os elementos Al, Fe, cobre (Cu), zinco (Zn) e manganês (Mn) foram quantificados utilizando um espectrômetro de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES) (modelo Optima 4300 DV, Perkin Elmer Sciex, Canadá).

4.2.6 Análises de expressão gênica por RT – qPCR

Para análise da expressão gênica, foi conduzido um experimento independente. Após 10 dias de tratamento foram coletadas raízes de *Oryza rufipogon* e *Oryza sativa* IRGA 429, 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 espécie por

tratamento em 4 repetições. A extração do RNA foi realizada utilizando o reagente Concert® seguindo as indicações do fabricante, e quantificado utilizando espectrofotômetro Nanodrop®. A síntese do cDNA foi realizada utilizando a enzima M-MLV (Invitrogen- Life Technologies Corporation), em seguida o cDNA foi armazenado à -20°C. A reação em tempo real (qPCR) foi realizada com o uso do aparelho StepOne Real-Time PCR Systems (AppliedBiosystems, Foster City, CA, USA), e os dados obtidos foram quantificados de acordo com o método de Livak; 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).

4.2.7 Análise Estatística

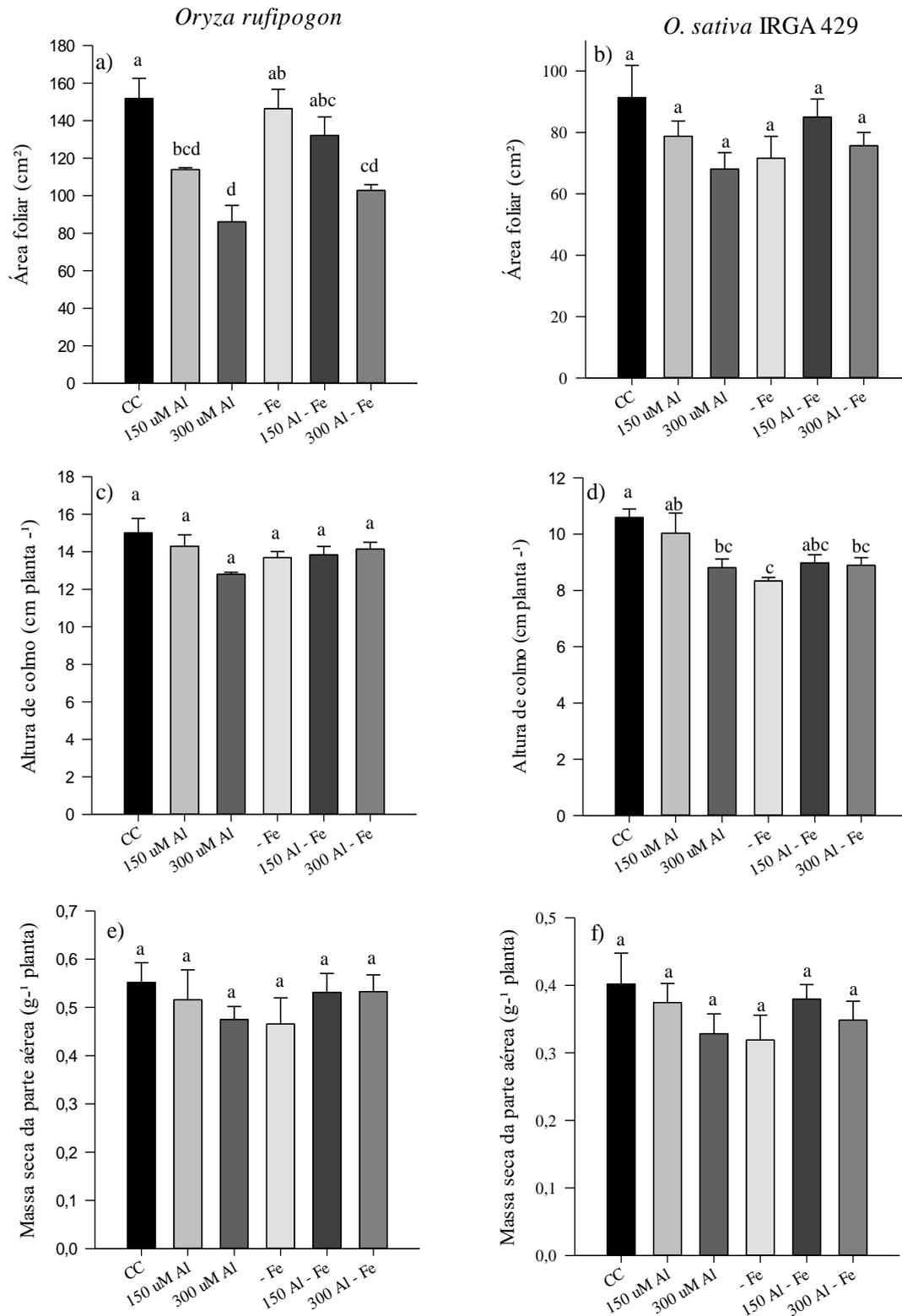
Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA). As médias dos tratamentos foram comparadas pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro, com o auxílio do programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2000). Os gráficos foram realizados com auxílio do programa SigmaPlot.

4.3.RESULTADOS

4.3.1. Variáveis de crescimento em plantas de *Oryza rufipogon* e *Oryza sativa*

Plantas de *O. rufipogon* apresentaram redução na área foliar na presença de 150µM de Al, 300µM de Al e na interação entre 300µM de Al e a deficiência de Fe (Figura 1a), os quais promoveram uma redução de 25, 43 e 32%, respectivamente, em comparação ao tratamento controle. Estes dados indicam um efeito mais proeminente do Al do que a deficiência de Fe na área foliar. Por outro lado, plantas de *O. sativa* cultivar IRGA 429 não sofreram reduções na área foliar em função dos tratamentos (Figura 1b). A altura de colmo não apresentou diferença significativa entre os tratamentos para *O. rufipogon* (Figura 1c), enquanto a espécie *O. sativa* apresentou menor altura de colmo na deficiência de Fe, seguido dos tratamentos 300µM de Al, -Fe + 300µM Al e -Fe + 150µM Al (Figura 1d). Esses resultados indicam que o efeito da toxidez por Al reduziu mais a área foliar de *O. rufipogon* enquanto o efeito da deficiência de Fe atingiu a altura de colmo de *O. sativa*.

Figura 1 –Área foliar, altura de colmo e massa seca de parte aérea de plantas de *Oryza rufipogon* e *Oryza sativa* cultivar IRGA 429 submetidas à deficiência de Fe e toxidez por Al.



Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa de *Oryza rufipogon* e *Oryza sativa* cultivar IRGA 429 entre os tratamentos pelo Teste de Tukey (P<0,05).

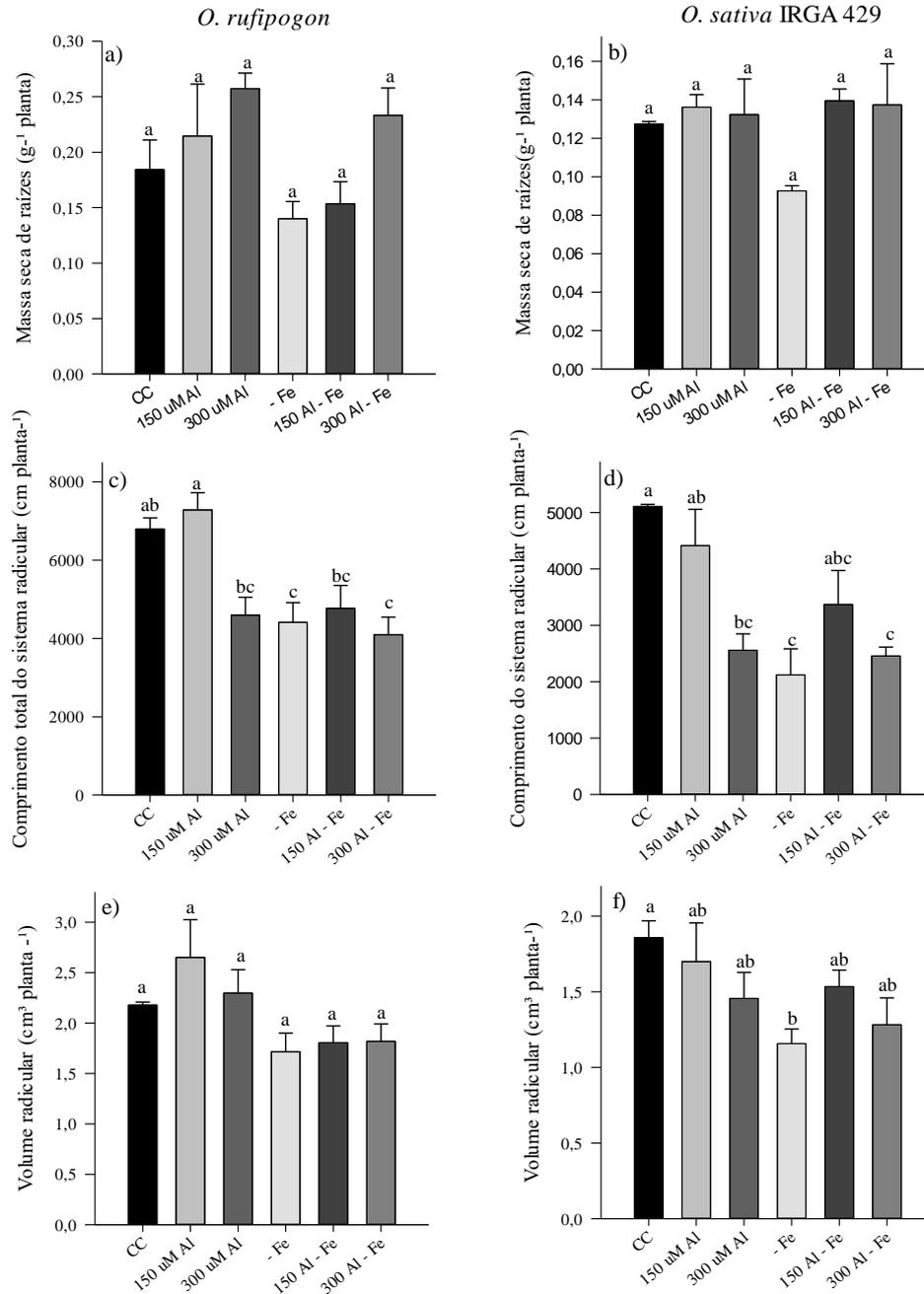
Após 21 dias de exposição aos tratamentos, a massa seca de parte aérea (Figura 1e; 1f) e de raízes (Figura 2a; 2b) não apresentou diferença significativa tanto para *O. rufipogon* quanto para *O. sativa* cultivar IRGA 424 entre os tratamentos. Embora a massa seca de parte aérea de *O. rufipogon* não tenha alterado com a presença de Al na solução nutritiva, os tratamentos de 300 μ M Al e -Fe + 300 μ M Al causaram redução na área foliar dessa espécie, o que pode indicar que as folhas apresentam o mesmo número de células, entretanto, folhas de plantas expostas aos tratamento contendo 300 μ M Al apresentam redução na expansão celular, com células menos túrgidas e, conseqüentemente, uma menor área foliar.

O comprimento do sistema radicular (Figura 2c; 2d) de ambas espécies apresentou menores valores dessa variável no tratamento de deficiência de Fe e da interação entre a deficiência de Fe + 300 μ M de Al. Além disso, a presença de 300 μ M de Al também promoveu uma redução no comprimento radicular em plantas de *O. sativa*, comparado com o tratamento controle. Em *O. rufipogon* houve redução do comprimento radicular de aproximadamente 40%, 35%, 32% e 30% nos tratamentos -Fe + 300 μ M Al, -Fe, 300 μ M de Al e -Fe + 150 μ M Al em relação ao tratamento de 150 μ M Al (Figura 2c). Em *O. sativa* as reduções do comprimento radicular foram aproximadamente 58%, 52% e 50% nos tratamentos de deficiência de Fe, -Fe + 300 μ M Al e 300 μ M de Al, respectivamente (Figura 2d). Entretanto, o tratamento de 150 μ M Al não reduziu o sistema radicular das duas espécies, apresentando valores que não diferiram estatisticamente do controle. Esses resultados evidenciam que 150 μ M de Al não causou toxidez no comprimento radicular, inclusive apresentando valores maiores no tratamento da interação entre a deficiência de Fe e 150 μ M de Al do que no tratamento de deficiência de Fe sem o acréscimo de Al (Figura 2c e 2d).

O volume radicular de plantas de *O. sativa* reduziu aproximadamente 38% no tratamento de deficiência de Fe, em relação ao controle. Mesmo com valores inferiores aos do tratamento controle, os tratamentos da interação entre a deficiência de Fe e toxidez por Al (-Fe + 150 μ M Al e -Fe + 300 μ M Al) apresentaram maior volume radicular que o tratamento de deficiência de Fe, indicando um maior volume radicular em *O. sativa* quando expostas ao Al em situações de baixo Fe (Figura 2f). Em plantas de *O. rufipogon* o volume radicular não apresentou diferença significativa entre os tratamentos (Figura 2d). Em *O. rufipogon* a maior área projetada do sistema radicular foi encontrada no tratamento de 150 μ M Al, seguido do tratamento controle, 300 μ M Al e -Fe + 150 μ M Al, os quais não diferiram estatisticamente, enquanto plantas dessa mesma espécie expostas aos tratamentos de deficiência de Fe e da interação entre a deficiência de Fe e 300 μ M Al, projetaram uma área do sistema radicular 29% menor que às do tratamento controle (Figura 3a). Mesmo apresentando comportamento similar,

a *O. sativa* obteve maior área projetada de raízes no tratamento controle, seguido do tratamento de 150 μ M Al. A menor área projetada foi encontrada no tratamento de deficiência de Fe, seguido de 300 μ M Al e de -Fe + 300 μ M Al. (Figura 3b).

Figura 2 - Massa seca de raízes, comprimento do sistema radicular e volume radicular de plantas de *Oryza rufipogon* e *Oryza sativa* cultivar IRGA 429 submetidas à deficiência de Fe e toxidez por Al.

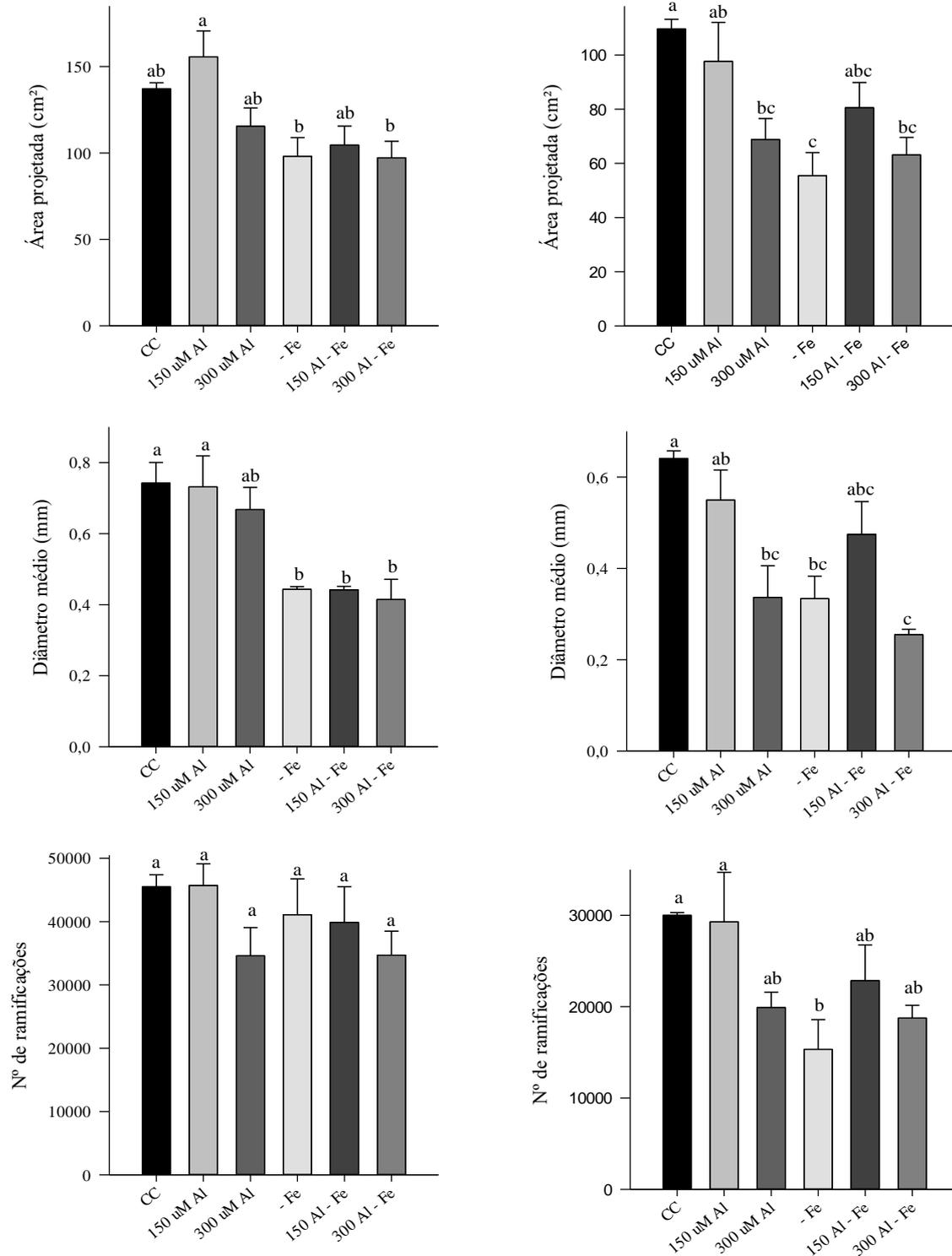


Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa de *Oryza rufipogon* e *Oryza sativa* cultivar IRGA 429 entre os tratamentos pelo Teste de Tukey (P<0,05).

O diâmetro médio de raízes sofreu reduções em *O. rufipogon* nos tratamentos envolvendo a deficiência de Fe (-Fe, -Fe +150 μ M Al e -Fe +300 μ M Al). A presença de 150 μ M de Al na solução nutritiva não alterou o diâmetro médio das raízes, uma vez que não diferiu dos valores de diâmetro encontrados na condição controle, enquanto 300 μ M de Al ocasionou uma pequena redução dessa variável (Figura 3c). Em *O. sativa*, o menor diâmetro foi encontrado no tratamento de -Fe +300 μ M Al, seguido dos tratamentos de deficiência de Fe e de 300 μ M Al. O tratamento de -Fe + 150 μ M Al apresentou raízes com um diâmetro maior que os demais tratamentos envolvendo a deficiência de Fe. Além disso, depois da condição controle, 150 μ M Al foi o tratamento que apresentou maior diâmetro médio de raízes (Figura 3d).

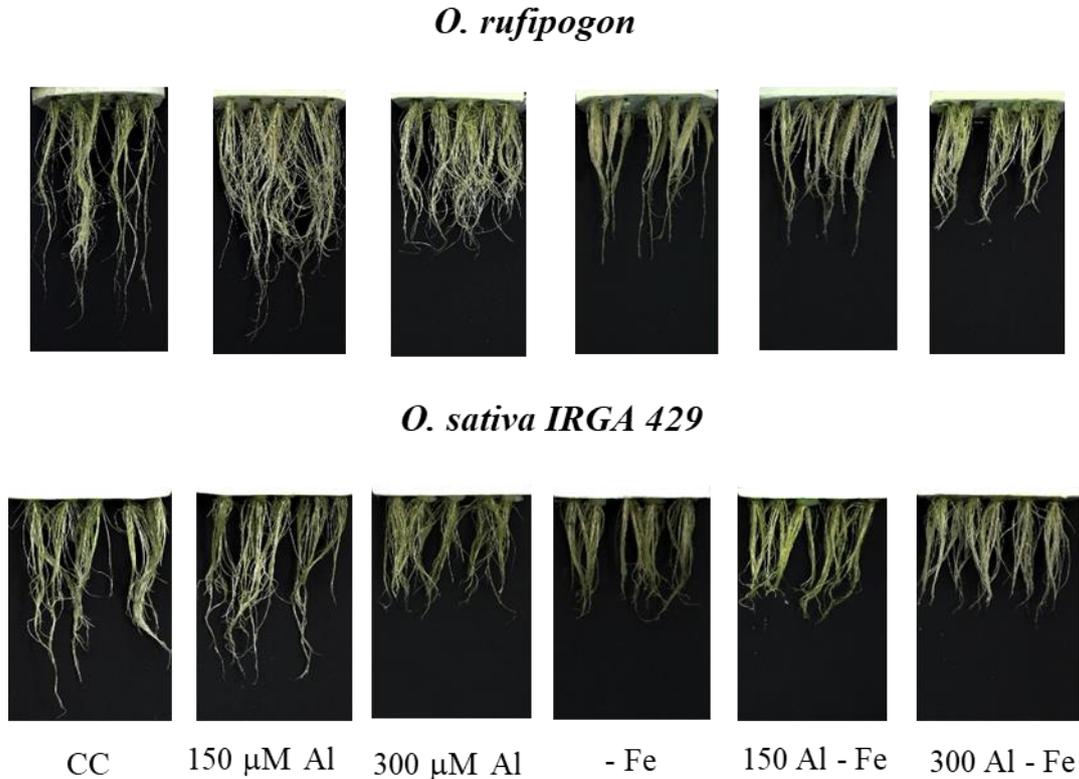
O número de ramificações das raízes de *O. rufipogon* não apresentou diferença significativa entre os tratamentos (Figura 3e), enquanto que em *O. sativa*, o tratamento de deficiência de ferro reduziu 49% o número de ramificações do sistema radicular (Figura 3f). Na figura 4 podemos observar o sistema radicular de *O. rufipogon* e *O. sativa* após 21 dias de exposição aos tratamentos.

Figura 3 - Área projetada da raiz, diâmetro médio de raízes e número de ramificações das raízes de plantas de *Oryza rufipogon* e *Oryza sativa* cultivar IRGA 429 submetidas à deficiência de Fe e toxidez por Al.



Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa de *Oryza rufipogon* e *Oryza sativa* cultivar IRGA 429 entre os tratamentos pelo Teste de Tukey ($P < 0,05$).

Figura 4 - Comparação do crescimento do sistema radicular de plantas de *Oryza rufipogon* e *Oryza sativa* cultivar IRGA 429 submetidas à deficiência de Fe e toxidez por Al aos 21 dias de exposição aos tratamentos.

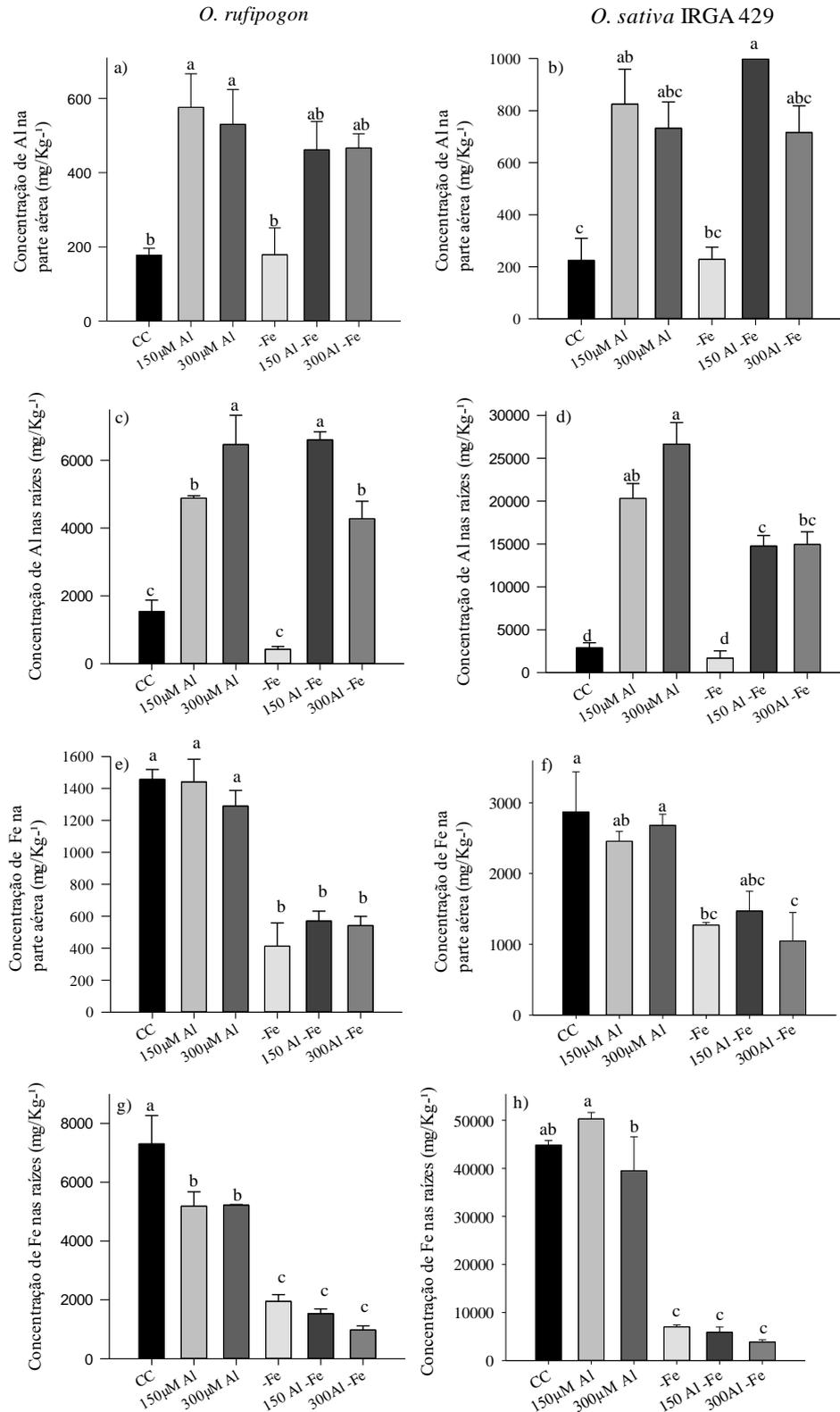


FONTE: ALVES, J.S. (2019).

4.3.2. Concentração de elementos nos tecidos foliares e radiculares de *Oryza rufipogon* e *Oryza sativa*

Após 21 dias de tratamento, plantas de *O. rufipogon* apresentaram maior concentração de Al nos tecidos foliares nos tratamentos de 150 e 300 μ M Al, enquanto *O. sativa* apresentou maior concentração de Al em folhas no tratamento de -Fe + 150 μ M Al (Figura 5a e 5b). A maior concentração de Al no sistema radicular das duas espécies ocorreu no tratamento de 300 μ M de Al. Quando plantas de *O. rufipogon* e *O. sativa* foram submetidas à 300 μ M de Al e deficiência de Fe, a concentração de Al nas raízes reduziu significativamente. Em *O. sativa* essa redução também ocorreu no tratamento de -Fe + 150 μ M Al em relação ao tratamento de 150 μ M sem deficiência de Fe (Figura 5c e 5d). De um modo geral, o acúmulo de Al foi maior nos tecidos do sistema radicular do que nos tecidos foliares, como esperado.

Figura 5 - Concentração de Al (a, b, c, d) e Fe (e, f, g, h) em tecidos de folhas e raízes de *Oryza rufipogon* e *Oryza sativa* cultivar IRGA 429 submetidas à deficiência de Fe e toxidez por Al aos 21 dias de tratamento.



Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa de *Oryza rufipogon* e *Oryza sativa* cultivar IRGA 429 entre os tratamentos pelo Teste de Tukey (P<0,05).

Também conforme esperado, menores concentrações de Fe foram encontradas nos tecidos foliares e radiculares nos tratamentos de deficiência de Fe (-Fe, -Fe + 150 μ M Al e -Fe + 300 μ M de Al) em ambas as espécies (Figura 5e, 5f, 5g e 5h). A presença de Al na solução nutritiva não alterou as concentrações de Fe na parte aérea das duas espécies (Figura 5e, 5f e 5h), enquanto raízes de *O. rufipogon* apresentaram concentrações de Fe menores às encontradas no controle quando expostas a 150 e 300 μ M de Al (Figura 5g). Em raízes de *O. sativa*, 300 μ M Al reduziu a concentração de Fe em comparação com o tratamento de 150 μ M Al (Figura 5h).

A concentração de Zn em raízes de *O. rufipogon* não apresentou diferença estatística nos tratamentos em relação ao controle (Figura 6c). Entretanto, houve reduções nas concentrações de Zn nos tecidos foliares no tratamento -Fe + 300 μ M Al em relação ao tratamento de deficiência de Fe (Figura 6a). Plantas de *O. sativa* em condição controle, deficiência de Fe e -Fe +150 μ M Al apresentaram maiores concentrações de Zn na raiz, enquanto 300 μ M de Al reduziu a concentração de Zn nas raízes em 52% em relação ao controle e o tratamento de -Fe +300 μ M Al em 48% em relação ao tratamento de deficiência de Fe (Figura 6d). A concentração de Zn nas folhas de *O. sativa* foi maior no tratamento de -Fe+150 μ M Al em relação ao controle, enquanto que o tratamento de -Fe+300 μ M Al reduziu a concentração de Zn nas folhas em relação ao tratamento de deficiência de Fe (Figura 6b).

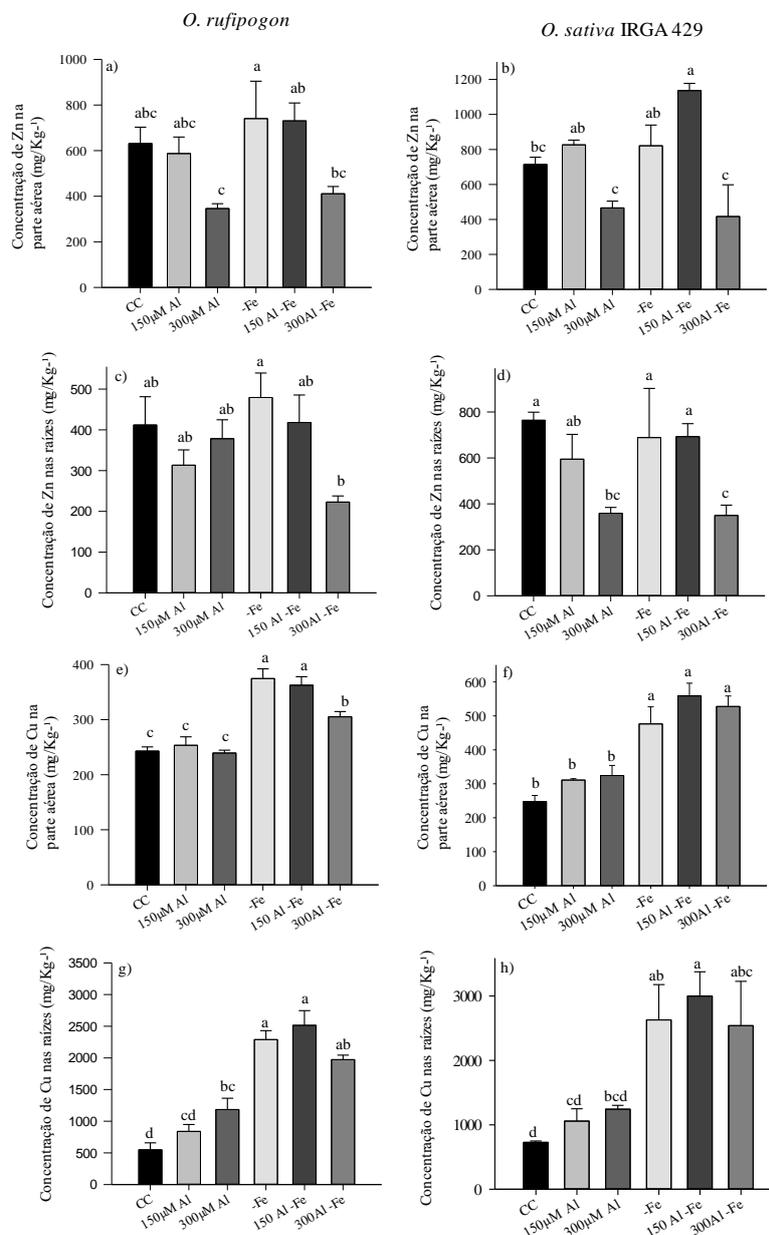
A deficiência de Fe alterou a homeostase de Cu em plantas de *O. rufipogon* e *O. sativa*. Como observado na figura 6e, 6f, 6g e 6h, as concentrações de Cu foram maiores, de uma forma geral, na raiz e na parte aérea quando as plantas foram expostas aos tratamentos de deficiência de Fe, -Fe +150 μ M Al e -Fe +300 μ M Al. Em *O. rufipogon*, 300 μ M Al também aumentou a concentração de Cu nas raízes (Figura 6g).

Em *O. rufipogon* a concentração de Mn nos tecidos foliares e radiculares foi menor em todos os tratamentos em relação ao controle, com exceção de folhas tratadas com 150 μ M Al (Figura 7a e 7c). Já *O. sativa* não apresentou redução na concentração de Mn nas folhas na presença de 150 μ M de Al em relação à condição controle, enquanto os demais tratamentos apresentaram as menores médias dessa variável (Figura 7b). A concentração de Mn nas raízes dessa espécie foi menor nos tratamentos contendo 300 μ M de Al, seguido do tratamentos de deficiência de Fe (Figura 7d).

A menor relação Fe:Zn nos tecidos foliares de *O. rufipogon* foi encontrada nas condições de deficiência de Fe e -Fe+150 μ M Al, indicando que quando a planta está em deficiência de Fe há um acúmulo maior de Zn nas folhas. Curiosamente, quando as plantas foram expostas à -Fe+300 μ M Al, a relação Fe:Zn aumenta, indicando que quando a planta está

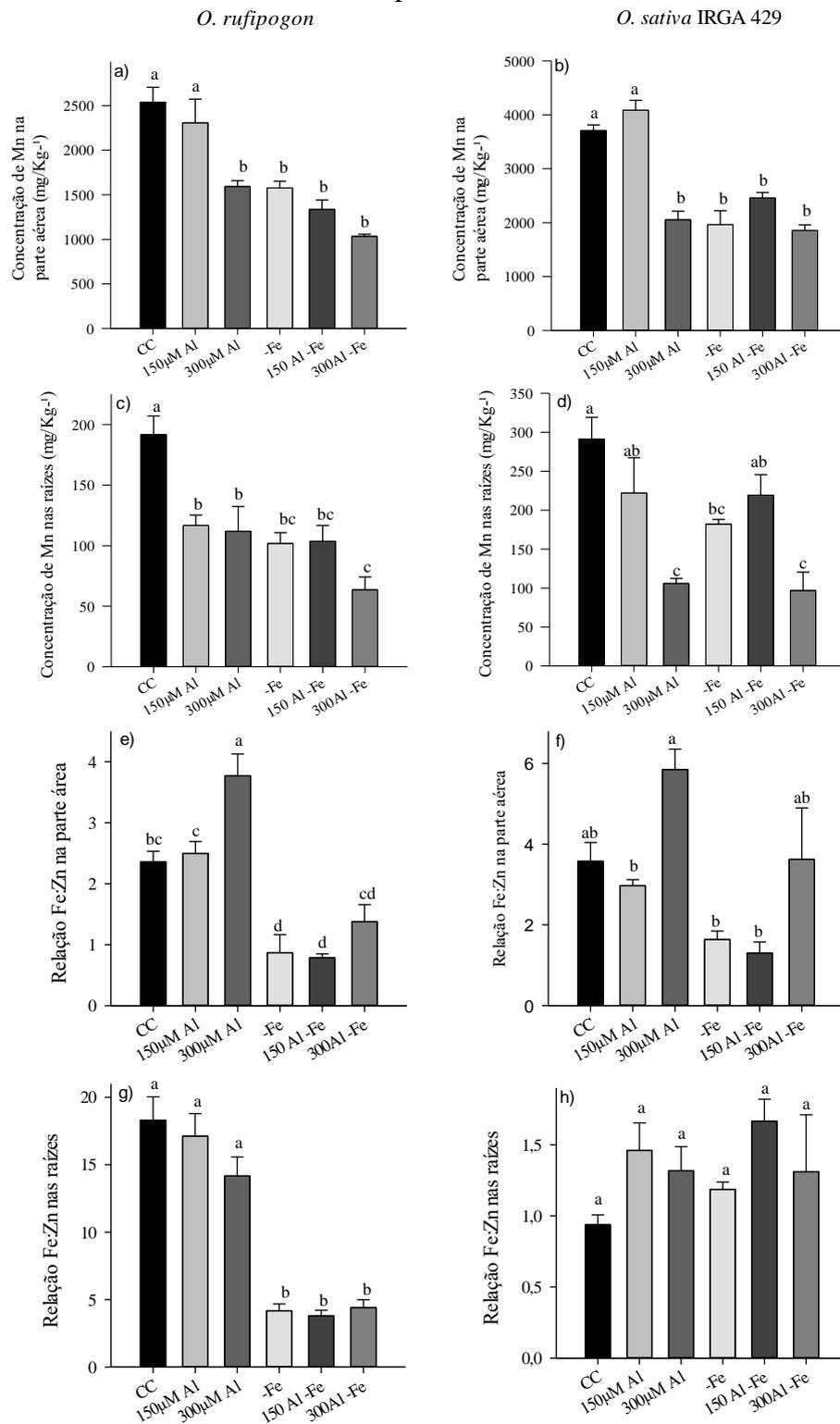
em deficiência de Fe e é exposta à 300 μ M Al, o teor de Fe nas folhas aumenta em relação ao tratamento de -Fe e -Fe +150 μ M (Figura 7e). A relação Fe:Zn nas raízes foi menor em todos os tratamentos, especialmente nos que envolvem a deficiência de Fe, comparado com o controle em *O. rufipogon* (Figura 7g), enquanto na *O. sativa* não houve diferença significativa entre os tratamentos na relação Fe:Zn tanto de parte aérea quanto de raízes, em relação ao tratamento controle (Figura 7f e 7h).

Figura 6 -Concentração de Zn (a, b, c, d) e Cu (e, f, g, h) em tecidos de folhas e raízes de *Oryza rufipogon* e *Oryza sativa* cultivar IRGA 429 submetidas à deficiência de Fe e toxidez por Al aos 21 dias de tratamento.



Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa de *Oryza rufipogon* e *Oryza sativa* cultivar IRGA 429 entre os tratamentos pelo Teste de Tukey (P<0,05).

Figura 7 -Concentração de Mn (a, b, c, d) e a razão entre a concentração de Fe:Zn (e, f, g, h) em tecidos de folhas e raízes de *Oryza rufipogon* e *Oryza sativa* cultivar IRGA 429 submetidas à deficiência de Fe e toxidez por Al aos 21 dias de tratamento.



Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa de *Oryza rufipogon* e *Oryza sativa* cultivar IRGA 429 entre os tratamentos pelo Teste de Tukey ($P < 0,05$).

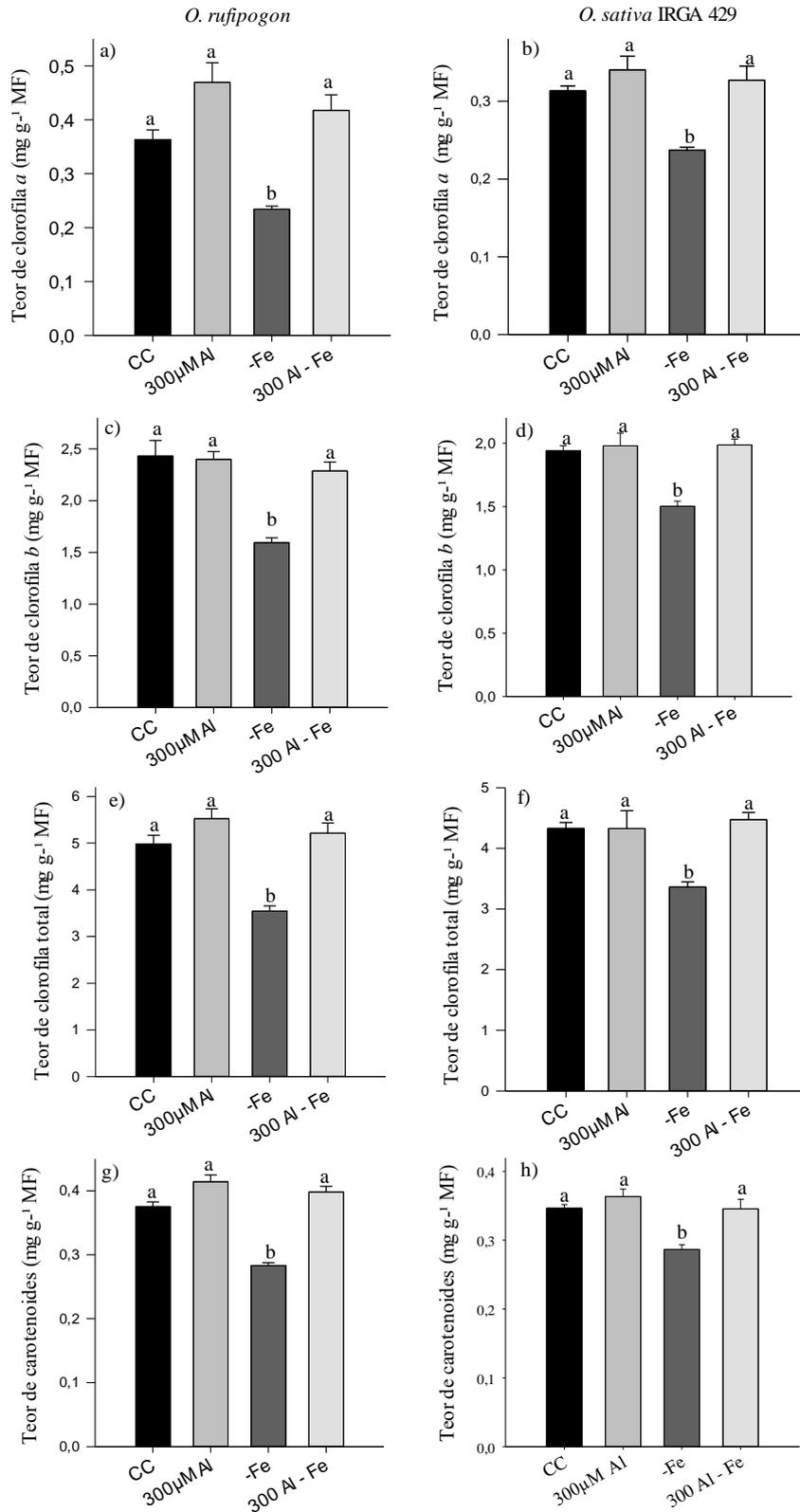
4.3.3. Pigmentos fotossintéticos

Foi mensurado o teor de clorofila *a* e *b*, clorofilas totais e carotenoides de folhas de *O. rufipogon* e *O. sativa* sob condição controle, 300 μ M Al, deficiência de Fe e -Fe + 300 μ M Al. Folhas de plantas expostas aos tratamentos contendo 150 μ M de Al não foram analisadas uma vez que as médias encontradas nas variáveis de crescimento não apresentaram diferença significativa da condição controle.

Em relação aos pigmentos fotossintéticos (Figura 8), tanto *O. rufipogon* quanto *O. sativa* não apresentaram diferenças na concentração de clorofilas e carotenoides na presença de 300 μ M de Al em relação à condição controle. No entanto, as plantas expostas ao tratamento de deficiência de Fe apresentaram redução de 22% na concentração de clorofilas totais e de 16% na concentração de carotenoides em *O. rufipogon* (Figura 8e e 8g). O mesmo ocorreu em *O. sativa*, a qual apresentou uma concentração de clorofila total e teor de carotenoides 29% e 23% menor em deficiência de Fe, respectivamente, em relação ao controle.

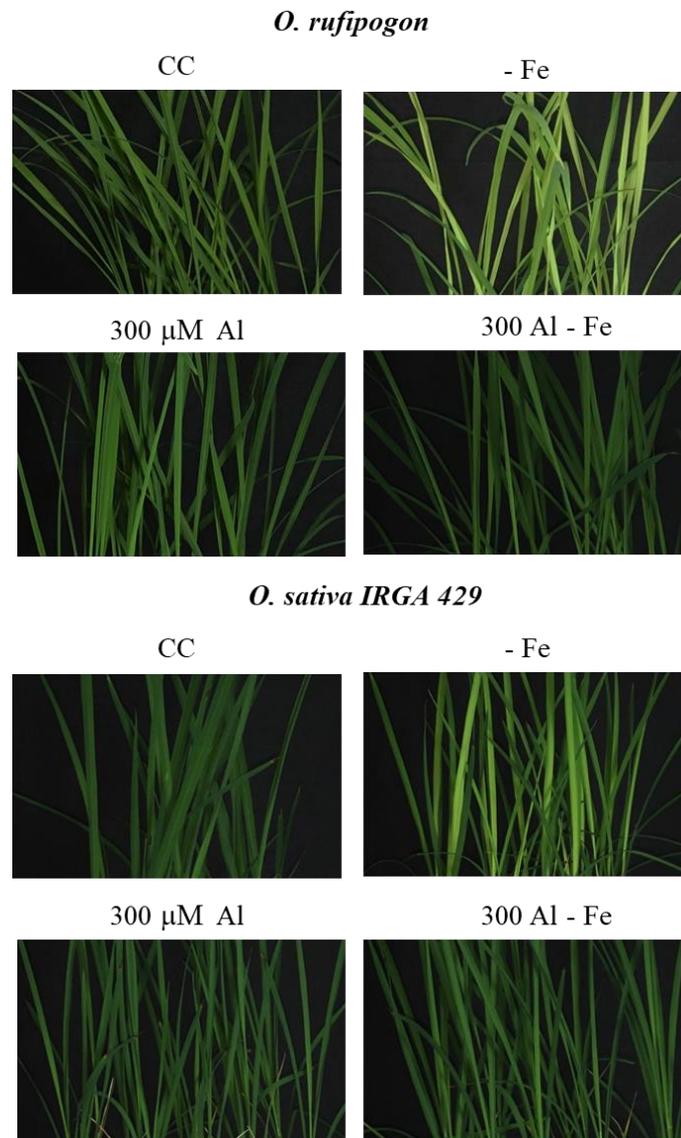
Curiosamente, quando as plantas foram expostas ao tratamento da interação entre a deficiência de Fe + 300 μ M de o teor de clorofila *a*, clorofila *b*, clorofila totais e carotenoides em ambas as espécies foi comparável ao controle (Figura 8). Esses resultados evidenciam um efeito benéfico do Al em condições de baixo Fe. Esse efeito pode ser visualizado na Figura 9. Assim, nossos dados mostram que 300 μ M de Al foram capazes de reverter os efeitos da deficiência de Fe sobre os pigmentos fotossintéticos.

Figura 8 - Concentração de carotenoides, clorofila *a*, clorofila *b* e clorofila total em folhas de plantas de *Oryza rufipogon* e *Oryza sativa* cultivar IRGA 429 submetidas à deficiência de Fe e toxidez por Al.



Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa de *Oryza rufipogon* e *Oryza sativa* cultivar IRGA 429 entre os tratamentos pelo Teste de Tukey (P < 0,05).

Figura 9 - Comparação de plantas de *Oryza rufipogon* e *Oryza sativa* cultivar IRGA 429 submetidas à deficiência de Fe e toxidez por Al aos 21 dias de tratamento.



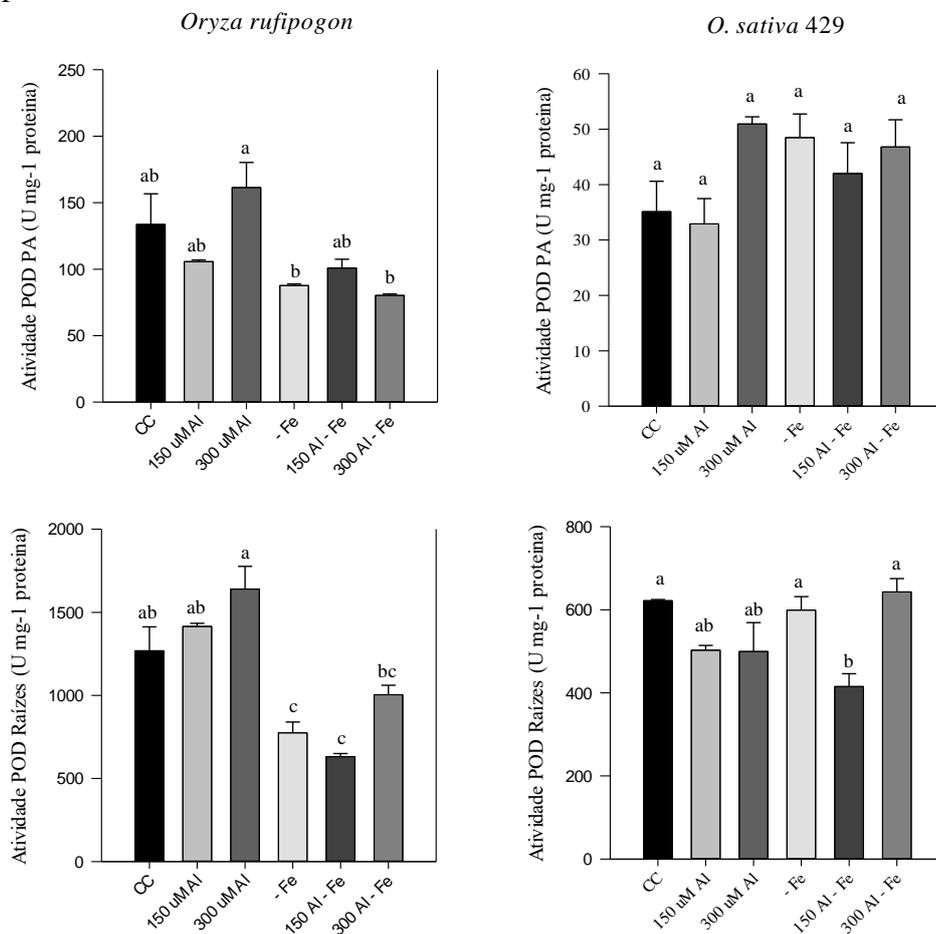
FONTE: ALVES, J.S. (2019).

4.3.4. Atividade da enzima Guaiacol Peroxidase (POD)

Nos tecidos foliares, *O. rufipogon* apresentou maior atividade da enzima POD no tratamento de 300 μ M de Al, comparado com os tratamentos -Fe e -Fe+ 300 μ M de Al (Figura 10a). Comparado com o controle, nenhum dos tratamentos apresentou efeito significativo na atividade da POD de parte aérea em ambas as espécies (Figura 10a e Figura 10b). Entretanto, quando em deficiência de Fe e -Fe+ 300 μ M de Al a atividade da enzima POD reduziu aproximadamente 50% em relação ao tratamento de 300 μ M de Al isolado.

Nos tecidos radiculares de *O. rufipogon*, maiores valores da atividade da enzima POD ocorreram nos tratamentos com Fe suficiente (controle, 150 e 300 μM de Al), enquanto nos tratamentos de deficiência de Fe e -Fe +150 μM ocorreram menores valores para essa variável (Figura 10c). Em *O. sativa*, a atividade da enzima POD nos tecidos radiculares reduziu no tratamento de -Fe+150 μM de Al em relação à condição controle, -Fe e -Fe+300 μM de Al (Figura 10d).

Figura 10 – Atividade da enzima Guaiacol Peroxidase (POD) em folhas e raízes de plantas de *Oryza rufipogon* e *Oryza sativa* cultivar IRGA 429 submetidas à deficiência de Fe e toxidez por Al.



Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa de *Oryza rufipogon* e *Oryza sativa* cultivar IRGA 429 entre os tratamentos pelo Teste de Tukey (P<0,05).

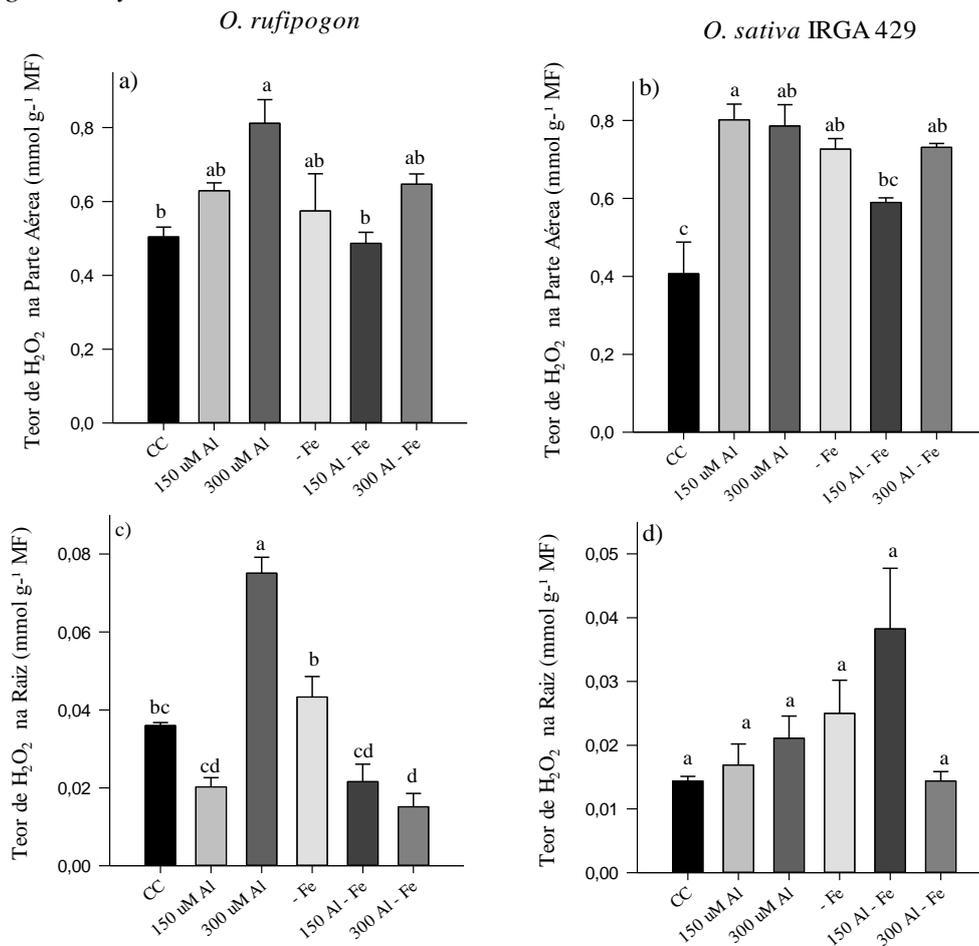
4.3.5. Concentração de Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2)

Houve maior concentração de H_2O_2 nos tecidos foliares de *O. rufipogon* em 300 μM Al, comparado com o tratamento controle. Menores concentrações foram encontradas no

tratamento controle e na presença de 150 μ M Al (Figura 11a). Para a *O. sativa* IRGA 429, a maior concentração de H₂O₂ nos tecidos foliares ocorreu em 150 μ M Al, seguido dos tratamentos de 300 μ M Al, deficiência de Fe e da interação entre a deficiência de Fe e 300 μ M Al. Ocorreu menores concentrações no tratamento controle e -Fe + 150 μ M Al, respectivamente (Figura 11b).

Já nos tecidos radiculares, a *O. rufipogon* apresentou maior concentração de H₂O₂ no tratamento de 300 μ M Al, comparado com o controle, enquanto que a menor concentração foi encontrada no tratamento da interação entre 300 μ M Al e a deficiência de Fe. Para os tratamentos 150 μ M Al e -Fe + 150 μ M, a concentração de H₂O₂ nos tecidos radiculares foi a mesma estatisticamente (Figura 11c). Já para *O. sativa* IRGA 429, a concentração de H₂O₂ nos tecidos radiculares não obteve diferença significativa entre os tratamentos (Figura 11d).

Figura 11 - Concentração de Peróxido de Hidrogênio em folhas e raízes de plantas de *Oryza rufipogon* e *Oryza sativa* cultivar IRGA 429 submetidas à deficiência de Fe e toxidez por Al.



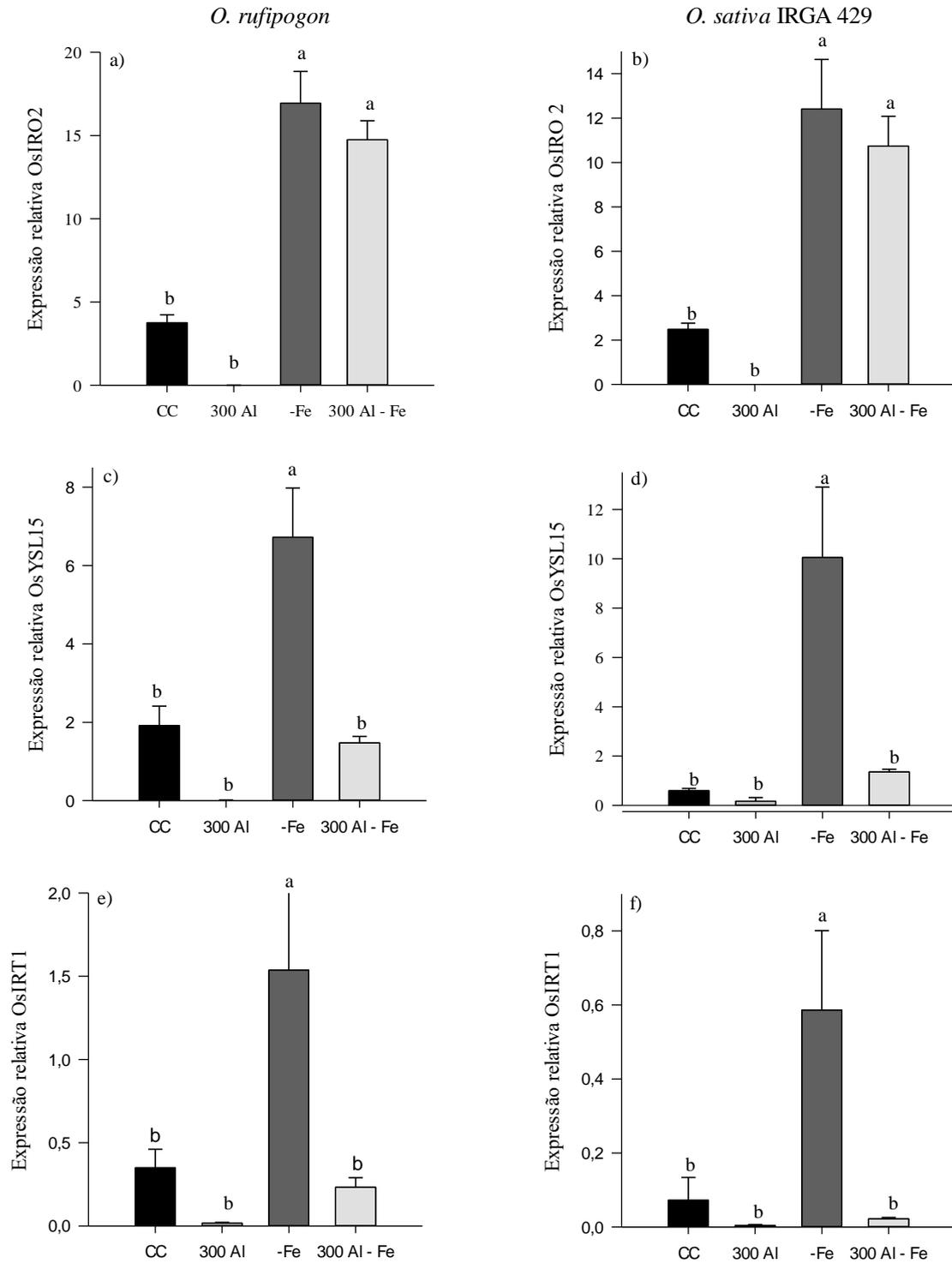
Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa de *Oryza rufipogon* e *Oryza sativa* cultivar IRGA 429 entre os tratamentos pelo Teste de Tukey (P<0,05).

4.3.6. Análise de expressão gênica

Foi quantificado por RT-qPCR a expressão relativa do fator de transcrição induzido por deficiência de Fe *OsIRO2* e dos transportadores de Fe *OsYSL15* e *OsIRT1* de raízes de *O. rufipogon* e *O. sativa* sob condição controle, 300 μ M Al, deficiência de Fe e -Fe +300 μ M de Al. Como esperado, *OsIRO2*, *OsYSL15* e *OsIRT1* foram induzidos em deficiência de Fe. Sob tratamento de excesso de Al, não houve indução nas raízes das duas espécies (Figura 12).

Curiosamente, os transportadores *OsYSL15* e *OsIRT1*, induzidos nas duas espécies sob deficiência de Fe, foram inibidos no tratamento combinado -Fe + 300 μ M Al, apresentando menores concentrações de transcritos que o tratamento de deficiência de Fe isolado (Figura 12c e 12d, 12e e 12f). O fator de transcrição *OsIRO2*, no entanto, apresentou a mesma inibição em raízes de *O. rufipogon* e *O. sativa* no tratamento combinado -Fe+300 μ M Al (Figura 12a e 12b).

Figura 12- Expressão relativa de *OsYSL15*, *OsIRO2* e *OsIRT1* de raízes de *Oryza rufipogon* e *Oryza sativa* IRGA 429 aos 10 dias de tratamento.



Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa de *Oryza rufipogon* e *Oryza sativa* cultivar IRGA 429 entre os tratamentos pelo Teste de Tukey ($P < 0,05$).

4.4.DISCUSSÃO

Entre os cereais cultivados, o arroz é considerado o mais tolerante ao estresse pelo Al. Famoso et al. (2010) demonstraram que o arroz é capaz de tolerar níveis maiores de Al que o milho, trigo e sorgo. O primeiro sintoma de toxidez por Al é a redução do sistema radicular (KOPITTKKE et al., 2015). Nossos dados mostraram que, enquanto no tratamento 150 μ M Al não houve redução do comprimento das raízes de *O. rufipogon* e *O. sativa* em relação ao controle, em 300 μ M Al houve redução de 32% e 50% no comprimento radicular de *O. rufipogon* e *O. sativa*, respectivamente (Figura 2c e 2d). Moreno-Alvarado et al. (2017) observaram um efeito benéfico do Al em concentrações de 200 μ M em cultivares *indica* de *O. sativa*. Esses autores relatam aumento de até 50% no comprimento radicular promovido pelo Al em relação ao controle. Essa diferença pode ser atribuída à metodologia aplicada em cada trabalho, sendo que no estudo de Moreno-Alvarado et al. (2017), o Al foi adicionado aos tratamentos 24 dias após a germinação das plantas de arroz, enquanto que no presente estudo os tratamentos foram adicionados à solução nutritiva 16 dias após a germinação. Essa diferença de idade das plantas, além das diferenças genéticas dos genótipos, pode ter influenciado nos resultados. Nossos resultados concordam com os encontrados por Gómez-Merino et al. (2014), onde o comprimento radicular de plantas de arroz submetidas à 200 μ M Al não diferiram estatisticamente dos valores encontrados em condição controle, enquanto que em 400 μ M Al houve redução em torno de 25%.

A resistência à toxidez por Al em arroz ocorre principalmente em função da exsudação de ácidos orgânicos induzidos por Al (POSCHENRIEDER et al., 2015). Em um trabalho de mapeamento de todo genoma e análise de QTL (*Quantitative Trait Loci*), Famoso et al. (2011) revelaram que três regiões estão envolvidas na variação da resistência ao Al, as quais correspondem provavelmente aos genes *ART1*, *STAR2* e *Nrat1*. *ART1* é um fator de transcrição que regula outros 31 genes (YAMAJI et al., 2009), dos quais vários são caracterizados por resistência ao Al, entre eles o *Nrat1*, o qual é um transportador de armazenamento de Al no vacúolo (MA et al., 2014). *STAR1/STAR2* formam um complexo que serve como transportador do tipo *ATP-binding cassette* (ABC), o qual é necessário para a detoxificação de Al na cultura do arroz (MA et al., 2005; HUANG et al., 2009).

A concentração de Al utilizada por Famoso et al. (2011) foi de 160 μ M, e nesse trabalho, a concentração de 150 μ M Al não causou reduções nos atributos de crescimento (altura de colmo, comprimento total do sistema radicular e área projetada do sistema radicular) em comparação ao controle, enquanto 300 μ M Al reduziu essas variáveis, indicando que *O.*

rufipogon e *O. sativa* podem ser tolerantes à 150µM Al (Figura 2 e Figura 3). O tipo de meio utilizado também pode explicar essas diferenças.

Outro ponto levantado por Famoso et al. (2011) é a domesticação do arroz selvagem *O. rufipogon*. A domesticação do arroz selvagem para o cultivado (*O. sativa*), grupos japônica e indica, ocorreu de forma independente do ancestral comum *O. rufipogon* (SWEENEY et al., 2007). Segundo Famoso et al. (2011), cultivares japônicas são duas vezes mais tolerantes que as cultivares índicas, e no presente estudo foi utilizado a cultivar índica *O. sativa* IRGA 429. Especula-se que as cultivares japônicas sejam mais resistentes por serem destinadas em sua maioria para o cultivo em terras altas, ou seja, arroz não irrigado, sendo mais expostas a condições de solos ácidos com toxidez por Al, sugerindo uma adaptação à solos ácidos (ZHAO et al., 2010).

A deficiência de Fe, assim como 300µM de Al, causou efeitos mais significativos que 150µM Al nos atributos de crescimento. Em comparação ao controle, plantas das duas espécies de arroz expostas à deficiência de Fe sofreram reduções no comprimento do sistema radicular, área projetada e diâmetro médio de raízes. O número de ramificações também foi reduzido em *O. sativa* em plantas sob deficiência de Fe em comparação ao controle (Figura 2 e Figura 3). A deficiência de Fe desencadeia alterações no sistema radicular como reduções no comprimento das raízes (IANOV et al., 2012). Vários estudos mostram que o Fe é um fator limitante no crescimento e acúmulo de biomassa em diferentes espécies (JIN et al., 2009; GIEHL et al., 2012; JIN et al., 2013). Nossos resultados indicam que a toxidez por Al e a deficiência de Fe alteram de forma independente os atributos de crescimento, uma vez que os sintomas em raízes não foram agravados quando os estresses foram testados de maneira integrada.

As concentrações de Al nas folhas de *O. rufipogon* e *O. sativa* foram maiores tanto nos tratamentos só com Al (150 e 300µM Al) quanto nos tratamentos combinados com deficiência de Fe (Figura 5a e 5b), em relação ao tratamento controle e de deficiência de Fe (sem adição de Al na solução nutritiva). Entretanto, nas raízes das plantas expostas ao tratamento de -Fe + 300µM Al, observamos uma redução na concentração de Al nos tecidos em comparação com o tratamento de 300µM Al (Figura 5c e 5d), indicando que plantas sob deficiência de Fe podem acumular menos Al nas raízes. Bityutskii et al. (2017) em um trabalho sobre a interação de Al, Fe e silício (Si) em cultivares de pepino, demonstraram que em condições de deficiência de Fe combinado com 400µM Al, a concentração e a taxa de translocação de Al no xilema aumentam significativamente em comparação à 400µM de Al com Fe suficiente, ou seja, o suprimento adequado de Fe diminui a translocação no xilema de Al para a parte aérea. Esses resultados

corroboram os encontrados no presente trabalho, onde na presença de Fe as plantas tendem a reter mais Al nas raízes que em deficiência de Fe.

O alumínio pode afetar negativamente a absorção e transporte de diferentes elementos (SILVA et al., 2010). Nossos dados mostram que o Al afetou negativamente a homeostase de Zn e Mn em raízes e parte aérea de *O. rufipogon* e *O. sativa*, reduzindo a concentração desses micronutrientes em relação ao controle (Figura 6a, 6b, 6c, 6d e Figura 7a, 7b, 7c e 7d). Esses dados corroboram os encontrados em outro trabalho de Bityutskii et al. (2017) sobre tolerância ao Al e eficiência no uso de Fe em cereais, onde o tratamento com Al reduziu significativamente o teor de Zn nas raízes de trigo, centeio, cevada e aveia, e nas folhas de centeio e aveia. Além do Zn, esses autores relatam que o Al reduziu a concentração de Mn nas folhas de aveia e trigo e nas raízes de cevada. Silva et al. (2010) observaram que após 24h de exposição de cultivares de trigo à 185µM, houve redução na concentração de Zn nas raízes, e após 72h de tratamento com Al, a concentração de Mn também foi reduzida em relação ao controle.

O mecanismo que causa desordem nutricional em plantas induzido pelo Al segue desconhecido (SINGH et al., 2017). No entanto, sabe-se que a toxidez por Al pode causar a formação de calose, a qual pode causar danos no transporte entre as células através dos plasmodesmos (SIVAGURU et al., 2000). Além da formação de calose, alguns estudos relacionam a redução na absorção de Zn e outros nutrientes na presença de Al a um efeito bloqueador do Al na enzima H⁺-ATPase na membrana plasmática, afetando a mobilidade dos íons (KOCHIAN; PINEROS; HOEKENGA, 2005; BÜYÜKKESKIN; AKINCI; EROĞLU, 2015). As interações do Al na membrana podem modificar a estrutura da membrana plasmática e o estado iônico próximo à célula, esses efeitos podem causar distúrbios nos processos de transporte de íons e afetar negativamente a homeostase celular (KOCHIAN; PINEROS; HOEKENGA, 2005).

A deficiência de Fe reduziu a concentração de Mn em raízes e folhas das duas espécies, corroborando os resultados encontrados por Bityutskii et al. (2017), onde a deficiência de Fe reduziu a concentração de Mn em folhas de aveia e raízes de cevada. No entanto, esses autores mostraram que apesar da presença do Al e a carência de Fe diminuírem o Mn nas raízes, o tratamento combinado de deficiência de Fe e toxidez por Al aumentou a concentração de Mn em raízes de cevada à níveis iguais ao das plantas em condição controle. Esse aumento na concentração de Mn não foi observado em nossos resultados. Ao contrário, raízes de *O. rufipogon* apresentaram menor concentração de Mn no tratamento de -Fe+300µM Al em relação à 300µM Al, e raízes de *O. sativa* apresentaram menor concentração de Mn em 300µM Al, -Fe + 300µM Al e deficiência de Fe (Figura 7c e 7d).

Sabe-se que a alta disponibilidade de Mn é um dos principais fatores que induzem a clorose por deficiência de Fe (LINDNER; HARLEY, 1944). Entretanto, as bases moleculares da interação antagonista entre Fe e Mn continuam incertas. Em *Arabidopsis*, Eroglu et al. (2015) demonstraram que o grau de deficiência de Fe induzido por Mn determina os níveis de transcrição do transportador MTP8, o qual é um componente do mecanismo de aquisição de Fe. Esses autores sugerem que a expressão de MTP8 em *Arabidopsis* é necessária para manter o crescimento sem clorose quando Mn estiver presente. As menores concentrações de Mn encontradas em deficiência de Fe no presente trabalho, podem ser uma resposta da planta para evitar a clorose que é agravada na presença de Mn em condições de baixo Fe.

Quanto à concentração de Cu nos tecidos, demonstramos que *O. rufipogon* e *O. sativa* sob deficiência de Fe acumulam mais Cu em folhas e raízes em relação ao tratamento controle, e 150 e 300 μM Al (Figura 6e, 6d, 6f e 6g). Foi observado por Waters et al. (2012) que plantas de *Arabidopsis thaliana* acumulam significativamente mais Cu quando estão em deficiência de Fe em relação à condição controle. Esses autores mostraram que em deficiência de Fe, genes de *FeSODs* são regulados negativamente e as proteínas são funcionalmente substituídas por *CuSOD*, e que o aumento na concentração de Cu é uma resposta adaptativa à deficiência de Fe.

No que diz respeito à produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), folhas e raízes de *O. rufipogon* apresentaram maior concentração de H_2O_2 no tratamento de 300 μM Al (Figura 11a e 11c), corroborando os dados de Chowra et al. (2017), que observaram um aumento significativo de H_2O_2 após 24h de tratamento com Al em folhas e raízes de *Vigna mungo* (L). Sabe-se que o Al induz formação de EROs (KOCHIAN et al., 2005; WU et al., 2012) e H_2O_2 pode servir como molécula sinalizadora para ativação de mecanismos de defesa de tolerância, entretanto, em maiores concentrações pode causar danos oxidativos e afetar o metabolismo celular (WU et al., 2012; GUPTA et al., 2013; CHOWARA et al., 2017). Possivelmente, essa alta concentração de H_2O_2 no tratamento de 300 μM Al tenha promovido um aumento na atividade da enzima antioxidante POD em tecidos de *O. rufipogon* (Figura 10a e 10b), indicando que a planta pode ter ativado seu sistema antioxidante na presença do Al, afim de regular a concentração interna de EROs. Cárcamo et al. (2019) relacionaram maior ativação de enzimas antioxidantes em plantas de mirtilo estressadas com Al à uma característica de cultivares tolerantes à toxidez por Al.

Em *O. sativa*, a produção de H_2O_2 não diferiu entre os tratamentos nas raízes (Figura 11d), enquanto que nas folhas, com exceção do tratamento de $-\text{Fe} + 150\mu\text{M}$, todos os tratamentos apresentaram concentração maior em relação ao controle (Figura 11b). Chen et al. (2017) consideram a produção de EROs em plantas deficientes de Fe como uma resposta que compõe

a regulação de mecanismos de tolerância à baixos teores de Fe. A atividade da POD em folhas de *O. sativa* não diferiu entre os tratamentos (Figura 10b), o que pode indicar que outras enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase, podem estar sendo responsáveis pela defesa antioxidante e manutenção dos níveis de EROs nessa espécie.

Sabe-se que a deficiência de Fe afeta vários processos fotossintéticos (MSILINI et al., 2013). Para aumentar a eficiência na absorção, utilização e distribuição de Fe, as plantas buscam adaptar seu metabolismo às condições do meio (VIGANI; BRIAT, 2016). Plantas deficientes em Fe têm processos dependentes de Fe, como respiração e cadeia de transporte de elétrons na fotossíntese, afetados negativamente (LUCENA; HERNANDEZ-APAOLAZA, 2017). Liu et al. (2015) demonstraram que a concentração de Fe solúvel controla vários parâmetros fotossintéticos no arroz, como a taxa de transporte de elétrons entre os fotossistemas. Esses autores verificaram uma drástica redução de clorofilas totais em plantas de arroz sob deficiência de Fe em relação a plantas com Fe suficiente. Esses resultados colaboram com o que encontramos nesse trabalho, onde plantas de *O. rufipogon* e *O. sativa* reduziram o teor de pigmentos fotossintéticos (clorofilas e carotenoides) sob deficiência de Fe (Figura 8). Embora não faça parte da estrutura da molécula da clorofila, o Fe é necessário para a biossíntese da clorofila (MARCHNER, 1995), o que justifica o declínio na concentração de clorofila encontrado no tratamento de deficiência de Fe.

Interessantemente, o tratamento $-Fe + 300\mu M Al$ não reduziu o teor de clorofilas e carotenoides de *O. rufipogon* e *O. sativa* após 21 dias de exposição (Figura 8). As plantas expostas a esse tratamento apresentaram folhas visualmente saudáveis, como as do tratamento controle e $300\mu M Al$, sem apresentar clorose internerval que caracteriza o fenótipo de deficiência de Fe (Figura 9). Alguns trabalhos vêm relatando um aumento no teor de pigmentos fotossintéticos de plantas expostas ao Al (HAJIBOLAND et al., 2013; NHAN; HAI, 2013; MORENO-ALVARADO et al., 2017). Nhan; Hai (2013) verificaram aumento no teor de clorofilas *a* e *b* e carotenoides em cultivares de arroz submetidas à $500\mu M Al$ por 8 dias, enquanto Moreno-Alvarado et al. (2017) verificaram um aumento significativo no teor de clorofilas em cultivares de arroz submetidas à $200\mu M$ de Al por 21 dias em relação ao controle. Embora o teor de pigmentos fotossintéticos em $300\mu M Al$ não tenha diferido do tratamento controle, esse efeito benéfico do Al pode estar relacionado com o incremento desses atributos no tratamento de $-Fe+300\mu M Al$.

Além do aumento no teor de pigmentos fotossintéticos, Nhan; Hai (2013), e Moreno-Alvarado et al. (2017) demonstraram que o Al aumenta a concentração de açúcares solúveis disponíveis. Segundo Moreno-Alvarado et al. (2017), o Al aumenta o teor de açúcares solúveis

e regula a expressão do fator de transcrição NAC, o qual pode aumentar a produção de biomassa no arroz.

Somado à isso, no presente trabalho, folhas de *O. rufipogon* no tratamento de $-Fe+300\mu M$ de Al apresentaram menores concentrações de Cu em relação ao tratamento de deficiência de Fe isolado (Figura 6e). O fenótipo de deficiência de Fe compartilha semelhanças com o de toxidez por Cu, como clorose das folhas e diminuição nos pigmentos fotossintéticos (PATSIKKA et al., 2002). No nosso trabalho, esses sintomas ocorreram em plantas expostas ao tratamento de deficiência de Fe, mas não ocorreram no tratamento de $-Fe + 300\mu M$ Al (Figura 8 e Figura 9). Embora o Cu substitua o Fe em algumas funções, não podemos atribuir somente a esse fenômeno o fenótipo do tratamento combinado, uma vez que a concentração de Cu diminuiu em folhas de *O. rufipogon* em $-Fe+300\mu M$ Al, mas pode indicar que a planta não está em deficiência de Fe, ou que a deficiência é menos severa na presença de $300\mu M$ Al.

Outra hipótese é sobre o Al diminuir o transporte de Zn para a parte aérea e reduzir os sintomas de deficiência de Fe. Nossos resultados mostram que $300\mu M$ Al reduz a concentração de Zn nas folhas de arroz em comparação com o tratamento de deficiência de Fe (Figura 6a e 6b). Lee; An (2009) demonstraram que os teores de Fe nas folhas diminuem quando a planta está em um meio com excesso de Zn e que a clorose causada pela deficiência de Fe é agravada pelo excesso de Zn. Esses autores mostraram que o transportador de Fe de alta afinidade *OsIRT1* pode transportar Zn além do Fe. Em um estudo com *Arabidopsis thaliana* e *Arabidopsis halleri*, Shanmugam et al. (2011) mostraram que em uma competição entre os dois metais, o Zn é prioritariamente transportado da raiz para a parte aérea. Nossos resultados podem indicar que a planta ao estar em deficiência de Fe, expressa *IRT1*, o qual pode absorver o Zn que está disponível em condições ideais, porém, quando a planta está exposta ao Al ($-Fe + 300\mu M$ Al) a concentração de Zn nos tecidos foliares é menor, podendo diminuir a clorose, como observado na Figura 9.

Essa hipótese também é fundamentada quando observamos a expressão relativa de *OsIRT1* em raízes de *O. rufipogon* e *O. sativa* (Figura 12e e 12f). A expressão relativa de *OsIRT1* foi significativamente menor no tratamento de $-Fe+300\mu M$ Al em comparação com a deficiência de Fe isolada, indicando que o metabolismo dessas plantas não estava percebendo a deficiência de Fe, o que também explica as menores concentrações de Zn encontradas nas folhas nos tratamentos envolvendo $300\mu M$ Al, uma vez que menores transcritos de *OsIRT1* foram observados no tratamento de $300\mu M$ Al.

Assim como o *OsIRT1*, o transportador *OsYSL15* foi induzido em raízes de *O. rufipogon* e *O. sativa* sob deficiência de Fe, mas no tratamento de $-Fe+300\mu M$ Al a expressão relativa foi

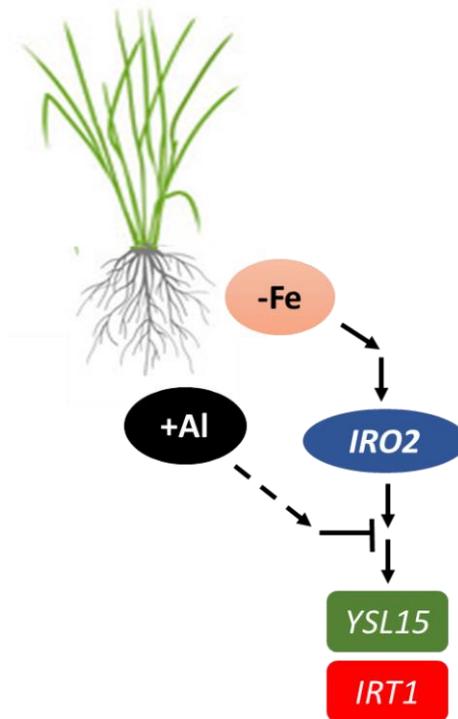
estatisticamente igual à encontrada no tratamento controle e em 300 μ M Al, onde o nível de Fe na solução nutritiva era suficiente (Figura 12c e 12d). O arroz, como toda gramínea, pode absorver Fe através da estratégia II, baseada na quelação através de fitosideróforos (PSs) que são liberados na rizosfera afim de quelar o Fe³⁺ e formar complexos de Fe (III)-PS, os quais são absorvidos pelas células da raiz por proteínas da família *YS* (*yellowstripe*) (CURIE et al., 2009). No arroz, a proteína transportadora *OsYSL15* transporta os complexos Fe (III)-PS nas raízes, sendo regulado pela deficiência de Fe e expresso na epiderme radicular (LEE et al., 2009).

Chen et al. (2018) observaram um aumento significativo na expressão de *OsYSL15* em plantas de arroz sob deficiência de Fe. Em um trabalho com raízes divididas e excisão de folhas para estudar a origem do sinal de deficiência de Fe, Chen et al. (2018), demonstraram que a remoção das folhas afeta o nível de expressão dos genes marcadores de deficiência *OsYSL15*, *OsNAS1* e *OsNAS2*, os quais não foram induzidos nas raízes sob deficiência de Fe quando as folhas foram removidas. Os dados obtidos por esses autores afirmam que ocorre um sinal de longa distância gerado na parte aérea em plantas de arroz deficientes em Fe e transmitidos às raízes através do floema.

No presente estudo, a deficiência de Fe também induziu *OsIRO2* em raízes de *O. rufipogon* e *O. sativa*, entretanto, diferente de *OsIRT1* e *OsYSL15*, a expressão relativa de *OsIRO2* em deficiência de Fe foi estatisticamente igual ao tratamento de -Fe+300 μ M Al (Figura 12a e 12b). *OsIRO2* é um fator de transcrição *bHLH* (*basic helix-loop-helix*) regulado positivamente por *IDEF1* (*irondeficiency-responsive element 1*) (KOBAYASHI et al., 2007; KOBAYASHI et al., 2009) e altamente induzido em deficiência de Fe (OGO et al., 2007). *OsIRO2* regula positivamente vários genes relacionados à Estratégia II, como *OsYSL15* e *OsNAS1*, além de afetar a expressão de outros fatores de transcrição induzidos em deficiência de Fe, os quais podem estar envolvidos na regulação indireta de genes abaixo de *OsIRO2* na cascata de regulação da resposta à deficiência de Fe (OGO et al., 2007). Kobayashi et al. (2007) e Ogo et al. (2007) propõe que existe uma sequência de respostas após a sinalização de deficiência de Fe que envolvem *IDEF1*, *OsIRO2* e seus reguladores.

Com base nos resultados encontrados no presente trabalho, podemos considerar que, em plantas de arroz das espécies *O. rufipogon* e *O. sativa* sob deficiência de Fe somado à toxidez por Al (-Fe+300 μ M Al), algum fator induzido por Al inibe os transportadores que estão abaixo na cascata de resposta à deficiência de Fe, como observamos no modelo proposto na Figura 13. Essa hipótese ainda precisa ser verificada.

Figura 13– Modelo proposto de regulação de repostas à interação entre deficiência de Fe e toxidez por Al em arroz.



Fonte: ALVES, J.S. (2019).

4.5.CONCLUSÃO

Plantas de *O. rufipogon* e *O. sativa* sob deficiência de Fe e toxidez por Al resgatam o fenótipo da condição controle, sem apresentar redução nos pigmentos fotossintéticos e folhas cloróticas encontradas em plantas expostas à deficiência de Fe sem a adição de 300 μ M Al, além de não induzirem significativamente os transportadores regulados por deficiência de Fe *OsIRT1* e *OsYSL15*. A hipótese de que algum fator induzido por Al inibe os transportadores que estão abaixo na cascata de resposta à deficiência de Fe deve ser melhor explorada.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALESSA, L.; OLIVEIRA, L. Aluminum toxicity studies in *Vaucheria longicaulis* var. *Macounii* (Xanthophyta, Tribophyceae) II. Effects on the F-Actin array. **Environmental and Experimental Botany**, v. 45, p. 223-237, 2001.

ALMEIDA, D. M.; ALMADANIM, M. C.; LOURENÇO, T.; ABREU, I. A.; SAIBO, N. J. M.; OLIVEIRA, M. M. Screening for Abiotic Stress Tolerance in Rice: Salt, Cold, and Drought. **Environmental Responses in Plants: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology**, v. 1398, 2016.

ALVAREZ, R. R.; GINER-MARTINEZ-SIERRA, J.; ORDUNA, J.; ORERA, I.; RODRIGUEZ-CASTRILLON, J. A. et al. Identification of a tri-iron(III), tri-citrate complex in the xylem sap of iron-deficient tomato resupplied with iron: new insights into plant iron long-distance transport. **Plant Cell Physiology**, v. 51, p. 91–102, 2010.

ARENHART, R. A.; LIMA, J. C.; PEDRON, M.; CARVALHO, F. E. L.; SILVEIRA, J. A.; ROSA, S. B.; CAVERZAN, A.; ANDRADE, C. M. B.; SCHÜNEMANN, M.; MARGIS, R.; MARGIS-PINHEIRO, M. Involvement of ASR genes in aluminium tolerance mechanisms in rice. **Plant, Cell & Environment**, v. 36, p. 52–67. 2013.

ARENHART, R. A.; MARGIS, R.; MARGIS-PINHEIRO, M. A putative role in the response to aluminum photosynthesis disturbance: the rice ASR5 protein. **Plant Signaling and Behavior**, v. 7, p. 1263–1266, 2012.

ARENHART, R. A.; YANG, B.; OLIVEIRA, L. F.; NETO, L. B.; SCHUNEMANN, M.; MARASCHIN, F. S.; MARGIS-PINHEIRO, M. New insights into aluminum tolerance in rice: the ASR5 protein binds the STAR1 promoter and other aluminum-responsive genes. **Molecular Plant**, v. 7, p. 709–721, 2014.

BASHIR, K.; INOUE, H.; NAGASAKA, S.; TAKAHASHI, M.; NAKANISHI, H.; et al. Cloning and characterization of deoxymugineic acid synthase genes from graminaceous plants. **Journal of Biological Chemistry**, v. 43, p. 32395–402, 2006.

BITYUTSKII, N.; DAVYDOVSKAYA, H.; YAKKONEN, K. Aluminum tolerance and micronutrient accumulation in cereal species contrasting in iron efficiency. **Journal of Plant Nutrition**, v. 40, p. 1152–1164, 2017.

BLANCO-ROJO, R.; VAQUERO, M. P. Iron bioavailability from food fortification to precision nutrition. A review. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 51, p. 126-138, 2019.

BOSE J.; BABOURINA O.; RENGEL Z. Role of magnesium in alleviation of aluminum toxicity in plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, p. 2251-2264, 2011.

BOUIS, H. E.; HOTZ, C.; MCCLAFFERTY, B.; MEENAKSHI, J. V. E.; PFEIFFER, W.H. Biofortificação: uma nova ferramenta para reduzir a desnutrição de micronutrientes. **Nutr. Touro.**, v. 32, p. 31S-40S, 2011.

BROADLEY, M.; BROWN, P.; CAKMAK, I.; RENGEL, Z.; ZHAO, F. Function of nutrients: micronutrients. In: MARSCHNER, P., ed. **Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants**, 3.ed. London, Academic Press Elsevier, p. 191-248, 2012.

Büyükkeskin, T.; Akinci, Ş.; Eroğlu, A. E. The Effects of Humic Acid on Root Development and Nutrient Uptake of *Vicia faba* L. (Broad Bean) Seedlings Grown Under Aluminum Toxicity. **Soil Science and Plant Analysis**, v. 46, p. 277-292, 2015.

CALLIATTE, R.; SCHIKORA, A.; BRIAT, J. F.; MARI, S.; CURIE, C. High-affinity manganese uptake by the metal transporter *NRAMP1* is essential for *Arabidopsis* growth in low manganese conditions. **Plant Cell**, v. 22, p. 904– 17, 2010.

CÁRCAMO, M. P.; REYES-DÍAZ, M.; RENGEL, Z.; ALBERDI, M.; OMENA-GARCIA, R. P.; NUNES-NESE, A.; INOSTROZA-BLANCHETEAU, C. Aluminum stress differentially affects physiological performance and metabolic compounds in cultivars of highbush blueberry. **Scientific Reports**, v. 9, 2019.

CHEN, L.; WANG, G.; CHEN, P.; ZHU, H.; WANG, S.; DING, Y. Shoot-Root Communication Plays a Key Role in Physiological Alterations of Rice (*Oryza sativa*) Under Iron Deficiency. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, 2018.

CHEN, Y.-T.; WANG, Y.; YEH, K.-C. Role of root exudates in metal acquisition and tolerance. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 39, p. 66–72, 2017.

CHENG, C. et al. Polyphyletic origin of cultivated rice: Based on the interspersed pattern of SINEs. **Molecular Biology and Evolution**, v. 20, p. 67–75, 2003.

CHOUHDURY, F. K.; RIVERO, R. M.; BLUMWALD, E.; MITTLER, R. Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination. **The Plant Journal**, v.90, 2016.

CHOWRA, U.; YANASE, E.; KOYAMA, H.; PANDA, S. K. Aluminium-induced excessive ROS causes cellular damage and metabolic shifts in black gram *Vigna mungo* (L.) Hepper. **Protoplasma**, v. 254, 2017.

ČIAMPOROVÁ, M. Morphological and structural responses of plant roots to aluminium at organ, tissue and cellular levels. **Biologia Plantarum**, v. 45, p. 161–171, 2002.

CONAB – Companhia nacional de Abastecimento. **Análise Mensal – Arroz – Junho/Julho de 2019**. 2019.

CONAB. **Acompanhamento de safra brasileira grãos**, v. 4 Safra 2016/17 - Sexto levantamento, Brasília, p. 1-176 março 2017.

CURIE, C.; CASSIN, G.; COUCH, D.; DIVOL, F.; HIGUCHI, K.; JEAN, L.; MISSON, J.; SCHIKORA, A.; CZERNIC, P.; MARI, S. Metal movement within the plant: contribution of nicotianamine and yellow stripe 1-like transporters. **Annals of Botany**, v. 103, 2009.

DABROWSKA, G.; KATA, A.; GOC, A.; SZECHYNSKA-HEBDA, M.; SKRYPEK, E. Characteristics of the plant ascorbate peroxidase family. **Acta Biol Cracow Ser Bot.**, v. 49, p. 7-17, 2007.

EBERHARD, S.; FINAZZI, G.; WOLLMAN, F.A. The dynamics of photosynthesis. **Annu. Rev. Genet.**, v. 42, p. 463–515, 2008.

EIDE, D.; BRODERIUS, M.; FETT, J.; GUERINOT, M. L. A novel iron-regulated metal transporter from plants identified by functional expression in yeast. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 93, p. 5624–28, 1996.

EMBRAPA. **Série Culturas: Arroz**. Comissão de Agricultura, Pecuária e Cooperativismo. Pelotas: Embrapa, p. 67, 2002.

EROGLU, S.; MEIER, B.; VON WIRÉN, N.; PEITER, E. The Vacuolar Manganese Transporter MTP8 Determines Tolerance to Iron Deficiency-Induced Chlorosis in Arabidopsis. **Plant Physiology**, v. 170, p. 1030–1045, 2015.

FAMOSO, A. N.; CLARK, R. T.; SHAFF, J. E.; CRAFT, E.; MCCOUCH, S. R.; KOCHIAN, L. V. Development of a Novel Aluminum Tolerance Phenotyping Platform Used for Comparisons of Cereal Aluminum Tolerance and Investigations into Rice Aluminum Tolerance Mechanisms. **Plant Physiology**, v. 154, p. 1678–1691, 2010.

FAN, W.; XU, J. M.; LOU, H. Q.; XIAO, C.; CHEN, W. W.; YANG, J. L. Physiological and molecular analysis of aluminum-induced organic acid anion secretion from grain amaranth (*Amaranthus hypochondriacus* L.) roots. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, p. 608, 2016.

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: 10/12/2017

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations FAOSTAT). **Rice Market monitor**. 2015 Disponível em: <<http://www.fao.org/economic/est/publications/ricepublications/ricemarketmonitorrmm>> Acesso em; 08/05/2018.

FILHO, M. P. B.; DYNIA, J. F.; FAGERIA N. K. Zinco e Ferro na cultura do Arroz. **EMBRAPA – SPI**, 1994.

FRANTZIOS, G.; GALATIS, B.; APOSTOLAKOS, P.; Aluminum effects on microtubule organization in dividing root tip cells of *Triticum turgidum*. II. Cytokinetic cells. **Journal of Plant Research**, v. 114, p. 157-170, 2001.

GARCIA-OLIVEIRA, A. L.; CHANDER, S.; ORTIZ, R.; MENKIR, A.; GEDIL, M. Genetic Basis and Breeding Perspectives of Grain Iron and Zinc Enrichment in Cereals. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, 2018.

GIEHL, R.F.; LIMA, J. E.; WIREN, N, V. Localized iron supply triggers lateral root elongation in Arabidopsis by altering the AUX1-mediated auxin distribution. **Plant Cell**, v. 24, p. 33–49, 2012.

GÓMEZ-MERINO, C. F.; TREJO-TÉLLEZ, L. I.; MARÍN-GARZA, T. Concentración de micronutrientos y crecimiento de raíz en variedades de arroz expuestas a aluminio. **Revista fitotecnica mexicana**, v. 37, p. 243 - 248, 2014.

GUNSE, B.; POSCHENRIEDER, CH.; BARCELÓ, J. Water transport properties of roots and root cortical cells in proton- and Al-stressed maize varieties. **Plant Physiology**, v. 113, p. 595-602, 1997.

GUO, P.; QI, Y.; YANG, L.; LAI, N.; YE, X.; YANG, Y.; CHEN, L. Root Adaptive Responses to Aluminum-Treatment Revealed by RNA-Seq in Two Citrus Species With Different Aluminum-Tolerance. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, 2017.

GUO, T.R.; YAO, P.C.; ZHANG, Z.D.; WANG, J.J.; WANG, M. Involvement of antioxidative defense system in rice growing seedlings exposed to Aluminum toxicity and Phosphorus deficiency. **Rice Science**, v.19, p. 207-212, 2012.

GUPTA, N.; GAURAV, S. S.; KUMAR, A. Molecular basis of aluminium toxicity in plants: A Review. **American Journal of Plant Sciences**, v. 4, p. 21–37, 2013.

GUPTA, N.; GAURAV, S. S.; KUMAR, A. Molecular basis of aluminium toxicity in plants: A Review. **American Journal of Plant Sciences**, v. 4, p. 21-37, 2013.

HAJIBOLAND, R.; BAHRAMI RAD, S.; BARCELÓ, J.; POSCHENRIEDER, C. Mechanisms of aluminum-induced growth stimulation in tea (*Camellia sinensis*). **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v. 176, p. 616–625, 2013.

HE, H.; HE, L.; GU, M. Signal transduction during aluminum-induced secretion of organic acids in plants. **Biology Plant**, v.59, p.601-608, 2015.

HELL, R.; STEPHAN, U.W. Iron uptake, trafficking and homeostasis in plants. **Planta**, v. 216, p. 541–551, 2003.

HUANG, C.F.; YAMAJI, N.; MITANI, N.; YANO, M.; NAGAMURA, Y.; MA, J. F. A bacterial-type ABC transporter is involved in aluminum tolerance in rice. **Plant Cell**, v. 21, p. 655–67, 2009.

INOUE, H.; KOBAYASHI, T.; NOZOYE, T.; TAKAHASHI, M.; KAKEI, Y.; et al. Rice *OsYSL15* is an iron-regulated iron(III)-deoxymugineic acid transporter expressed in the roots and is essential for iron uptake in early growth of the seedlings. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, p. 3470–79, 2009.

IRGA – Instituto Rio Grandense do Arroz. **Boletim de resultados da lavoura - safra 2018/19 – arroz irrigado e soja em rotação**. 2019.

ISHIMARU, Y.; SUZUKI, M.; TSUKAMOTO, T.; SUZUKI, K.; NAKAZONO, M. et al. Rice plants take up iron as an Fe³⁺-phytosiderophore and as Fe²⁺. **Plant Journal**, v. 45, p. 335–46, 2006.

IVANOV, R.; BRUMBAROVA, T.; BAUER, P. Fitting into the harsh reality: regulation of iron-deficiency responses in dicotyledonous plants. **Molecular Plant**, v. 5, p. 27–42, 2012.

IVANOV, R.; BRUMBAROVA, T.; BAUER, P. Fitting into the Harsh Reality: Regulation of Iron-deficiency Responses in Dicotyledonous. **Plants. Molecular Plant**, v. 5, p. 27–42, 2012.

JIN, C. W.; LIU, Y.; MAO, Q. Q.; WANG, Q.; DU, S. T. Mild Fe-deficiency improves biomass production and quality of hydroponic-cultivated spinach plants (*Spinacia oleracea* L.). **Food Chemistry**, v. 138, p. 2188–2194, 2013.

JIN, C.W.; DU S. T.; CHEN W. W.; LI, G.X.; ZHANG, Y. S.; ZHENG, S. J. Elevated carbon dioxide improves plant iron nutrition through enhancing the iron-deficiency-induced responses under ironlimited conditions in tomato. **Plant Physiology**, v. 150, p. 272–280, 2009.

KHUSH, G. S. What it will take to Feed 5.0 Billion Rice consumers in 2030. **Plant Molecular Biology**, v. 59, p. 1-6, 2005.

KIM, J.; REES, D. C. Structural models for the metal centers in the nitrogenous molybdenum-iron protein. **Science**, v. 257, p. 1677-82, 1992.

KIM, S. J.; LEE, S.; HONG, S. K.; AN, K.; AN, G; KIM, S. Ectopic expression of a cold-responsive OsAsr1 cDNA gives enhanced cold tolerance in transgenic rice plants. **Molecules and Cells**, v. 27, p. 449–458, 2009.

KOBAYASHI, T.; ITAI, R.N.; OGO, Y.; KAKEI, Y.; NAKANISHI, H. et al. The rice transcription factor *IDEF1* is essential for the early response to iron deficiency, and induces vegetative expression of late embryogenesis abundant genes. **Plant Journal**, v. 60, p. 948–61, 2009.

KOBAYASHI, T.; NISHIZAWA, N. K. Iron Uptake, Translocation, and Regulation in Higher Plants. *Annu. Rev. Plant Biology*, v. 63, p. 131–52, 2012.

KOBAYASHI, T.; OGO, Y.; ITAI, R. N.; NAKANISHI, H.; TAKAHASHI, M. et al. The transcription factor *IDEF1* regulates the response to and tolerance of iron deficiency in plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America)**, v. 104, p. 19150–55, 2007.

KOCHIAN, L. V. et al. Plant Adaptation to Acid Soils: The Molecular Basis for Crop Aluminum Resistance. **Annual Review Plant Biology**, v.015, 2015.

KOCHIAN, L. V.; PIÑEROS, M. A.; HOEKENGA, O. A. The physiology, genetics and molecular biology of plant aluminum resistance and toxicity. *Root Physiology: From Gene to Function*, p. 175–195, 2005.

KOCHIAN, L.; PINEROS, M. A.; HOEKENGA, O. A. The physiology, genetics and molecular biology of plant aluminum resistance and toxicity. **Plant and Soil**, v. 274, p. 175-195, 2005.

- KOCHIAN, U.; YANASE, E.; KOYAMA, H.; PANDA, S. K. Aluminium-induced excessive ROS causes cellular damage and metabolic shifts in black gram *Vigna mungo* (L.) Hepper. **Protoplasma**, v. 254, p. 293–302, 2016.
- KOPITTKKE, P. M. Role of phytohormones in aluminium rhizotoxicity. **Plant Cell Environment**, v. 39, p.2319-2328, 2016.
- KOPITTKKE, P. M.; MOORE, K. L.; LOMBI, E.; GIANONCELLI, A.; FERGUSON, B. J.; BLAMEY, F. P.; MENZIES, N.W.; NICHOLSON, T.M.; MCKENNA, B.A.; WANG, P.; GRESSHOFF, P. M. Identification of the primary lesion of toxic aluminum in plant roots. **Plant Physiology**, v. 167, p. 1402-1411, 2015.
- LEE, S.; AN, G. Over-expression of *OsIRT1* leads to increased iron and zinc accumulations in rice. **Plant, cell & environment**, v. 32, p. 408–416. 2009.
- LEE, Y. P.; KIM, S. H.; BANG, J. W.; LEE, H. S.; KWAK, S. S.; KWON, S. Y. Enhanced tolerance to oxidative stress in transgenic tobacco plants expressing three antioxidant enzymes in chloroplasts. **Plant Cell Reports**, v. 26, p. 591-598, 2007.
- LINDNER, R.C.; HARLEY, C.P. Nutrient interrelations in lime-induced chlorosis. **Plant Physiology**, v. 19, 1944.
- LIU, H.-Y.; DAI, J.-R.; FENG, D.-R.; LIU, B.; WANG, H.-B.; AND WANG, J.-F. Characterization of a novel plantain *Asr* gene, *MpAsr*, that is regulated in response to infection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* and abiotic stresses. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 52, p. 315–323. 2010.
- LIU, J.; MAGALHAES, J. V.; SHAFF, J.; KOCHIAN, L. V. Aluminum-activated citrate and malate transporters from the MATE and ALMT families function independently to confer Arabidopsis aluminum tolerance. **The Plant Journal**, v. 57, p. 389–399, 2010.
- LONDO, J. P.; CHIANG, Y.; HUNG; CHIANG, T. K.; SCHAAL, B. A. Phylogeography of Asian wild rice, *Oryza rufipogon*, reveals multiple independent domestications of cultivated rice, *Oryza sativa*. **National Academy of Sciences**, v. 103, p. 9578-9583, 2006.
- LUCENA, J. J.; HERNANDEZ-APAOLAZA, L. Iron nutrition in plants: an overview. **Plant Soil**, v. 418, p. 1-4, 2017.
- MA, J. F.; NAGAO, S.; HUANG, C. F.; NISHIMURA, M. Isolation and characterization of a rice mutant hypersensitive to Al. **Plant Cell and Physiology**, v. 46, p. 1054–1061, 2005.
- MA, J. F.; CHEN, Z. C.; SHEN, R. F. Molecular mechanisms of Al tolerance in gramineous plants. **Plant and Soil**, v. 381, p. 1–12, 2014.
- MACÊDO, C. E. C.; VAN SINT JAN, V.; KINET, J.-M.; LUTTS, S. Effects of aluminium on root growth and apical root cells in rice (*Oryza sativa* L.) cultivars. Reliability of screening tests

to detect Al resistance at the seedling stage. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 31, p. 1255–1262, 2009.

MAGALHAES, J. V. How a microbial drug transporter became essential for crop cultivation on acid soils: aluminium tolerance conferred by the multidrug and toxic compound extrusion (MATE) family. **Annals of Botany**, v. 106, p. 199–203, 2010.

MARSCHNER, H. 1995. **Mineral Nutrition of Higher Plants**. London: Academic, 2nd ed. 1995.

MARSCHNER, H.; RÖMHELD, V. Strategies of plants for acquisition of iron. **Plant Soil** v. 165. 1994.

MIGUEL, P. S. B. et al. Efeitos tóxicos do alumínio no crescimento das plantas: mecanismos de tolerância, sintomas, efeitos fisiológicos, bioquímicos e controles genéticos. **CES Revista**, v.24, p.13-29, 2010.

MORENO-ALVARADO, M.; GARCÍA-MORALES, S.; TREJO-TÉLLEZ, L. I.; HIDALGO-CONTRERAS, J. V.; GÓMEZ-MERINO, F. C. Aluminum Enhances Growth and Sugar Concentration, Alters Macronutrient Status and Regulates the Expression of NAC Transcription Factors in Rice. **Frontiers in Plant Science**, v.8, 2017.

MOTTA, A. C. V.; MONTE SERRA, B.; REISSMAN, C. B.; DIONÍSIO, J. A. Micronutrientes na rocha, no solo e na planta. **Synergismus scyentifica**, v. 04. 2007.

MSILINI, N.; ESSEMINE, J.; ZAGHDOUDI, M.; HARNOIS, J.; LACHAÂL M.; OUERGHI, Z.; CARPENTIER, R. How does iron deficiency disrupt the electron flow in photosystem I of lettuce leaves? **Journal of Plant Physiology**, v. 170, p. 1400–1406, 2013.

MSILINI, N.; ESSEMINE, J.; ZAGHDOUDI, M.; HARNOIS, J.; LACHAÂL, M.; OUERGHI, Z.; CARPENTIER, R. How does iron deficiency disrupt the electron flow in photosystem I of lettuce leaves? **Journal of Plant Physiology**, v. 170, p. 1400–1406, 2013.

NEPA- Núcleo de estudos e pesquisa em alimentação. **Tabela brasileira de composição de alimentos**. Campinas: Unicamp, p. 161, 2011.

NHAN, P. P.; HAI, N. T. Amelioration of aluminum toxicity on OM4900 rice seedlings by sodium silicate. **African Journal of Plant Science**, v. 7, p. 208–212, 2013.

OGO, Y.; ITAI, R. N.; NAKANISHI, H.; KOBAYASHI, T.; TAKAHASHI, M.; MORI, S.; NISHIZAWA, N. K. The rice *bHLH* protein *OsIRO2* is an essential regulator of the genes involved in Fe uptake under Fe-deficient conditions. **The Plant Journal**, v. 51. 2007.

OKA. H.I. Origin of Cultivated Rice. **Elsevier**, Amsterdam, 1988.

OMOTE, H.; HIASA, M.; MATSUMOTO, T.; OTSUKA, M.; MORIYAMA, Y. The MATE proteins as fundamental transporters of metabolic and xenobiotic organic cations. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 27, p. 587–593, 2006.

OMS- Organização Mundial da Saúde- (2016). Anemia por deficiência de ferro. Disponível em: <http://www.who.int/nutrition/topics/ida/en/> [acessado em 29 de julho de 2019]

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

PANDA, S. K.; BALUSKA, F.; MATSUMOTO, H. Aluminum stress signaling in plants. **Plant Signal Behav.**, v. 4, p. 592–597, 2009.

PATSIKKA, E. 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.

PÄTSIKKÄ, E.; KAIRAVUO, M.; ŠERŠEN, F.; ARO, E.M.; TYYSTJÄRVI, E. 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.

PEDAS, P.; YTTING, C. K.; FUGLSANG, A.T.; JAHN, T. P.; SCHJOERRING, J.K.; HUSTED, S. Manganese efficiency in barley: identification and characterization of the metal ion transporter HvIRT1. **Plant Physiology**, v. 148, p. 455–66, 2008.

PONNAMPERUMA, F. N. Limitaciones de microelementos en suelos ácidos arroceroestropicales. In: BORNEMISZA, E.; CARVALHO, A. **Manejo de suelos em La America Latina Tropical**, p 336-354, 1975.

POSCHENRIEDER, C.; TOLRÀ, R.; HAJIBOLAND, R.; ARROYAVE, C.; BARCELÓ, J. Mechanisms of Hyper-resistance and Hyper-tolerance to Aluminum in Plants. **Signaling and Communication in Plants**, p. 81–98, 2015.

PRENTICE, A. M.; MENDOZA, Y. A.; PEREIRA, D.; CERAMI, C.; WEGMULLER, R.; CONSTABLE, A.; SPIELDENNER, J. Dietary strategies for improving iron status: Balancing safety and efficacy. **Nutrition Reviews**, v. 75, p. 49-60, 2017.

QIU, W.; WANG, N.; DAI, J.; WANG, T.; KOCHIAN, L. V.; LIU, J.; ZUO, Y. AhFRDL1 mediated citrate secretion contributes to adaptation of peanuts for Fe deficiency and Al stress. **Journal of Experimental Botany**, v. 70, p. 2873–2886, 2019.

RAHMAN, M.; IJAZ, M.; QAMAR, S.; BUKHARI, S. A.; MALIK, K. **Advances in Rice Research for Abiotic Stress Tolerance**. Elsevier, p. 299-312, 2019.

RAVET, K.; REYT, G.; ARNAUD, N.; KROUK, G.; DJOUANI, E.; BOUCHEREZ, J.; BRIAT, J.; GAYMARD, F. Iron and ROS control of the DownStream mRNA decay pathway is essential for plant fitness. **The EMBO Journal**, v. 3, p. 175–186, 2012.

RAVET, K.; TOURAINE, B.; BOUCHEREZ, J.; BRIAT, J. F.; GAYMARD, F.; CELLIER, F. Ferritins control interaction between iron homeostasis and oxidative stress in *Arabidopsis*. **Plant Journal**, v. 57, p. 400–412, 2009.

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, 2011.

ROBINSON, N. J.; PROCTER, C. M.; CONNOLLY, E.L.; GUERINOT, M.L. A ferric-chelate reductase for iron uptake from soils. **Natureza**, v. 397, p. 694-697, 1999.

ROGERS, E. E.; GUERINOT, M. L. FRD3, a member of the multidrug and toxin efflux family, controls iron deficiency responses in *Arabidopsis*. **Plant Cell**, v. 14, p. 1787–99, 2002.

RÖMHELD, V.; MARSCHNER, H. Evidência de um sistema de captação específico para fitossideróforos de ferro em raízes de gramíneas. **Physiology vegetal**, v. 80, p. 175-180, 1986.

SAMARANAYAKE, P.; PEIRIS, B. D.; DSSANAYAKE, S. Effect of excessive ferrous (Fe²⁺) on growth and iron content in rice (*Oryza sativa*). **International Journal of Agriculture and Biology**, v. 14, p. 296-298, 2012.

SANTI, S. SCHMIDT, W. Dissecting iron deficiency-induced proton exclusion in *Arabidopsis* roots. **New Phytologist**. v. 183, p. 1072–84, 2009.

SCHMITT, M.; WATANABE, T.; JANSEN, S. The effects of aluminium on plant growth in a temperate and deciduous aluminium accumulating species. **AoB Plants**, v. 08, 2016.

SCHMITT, M.; WATANABE, T.; JANSEN, S. The effects of aluminium on plant growth in a temperate and deciduous aluminium accumulating species. **AoB Plants**, v. 8, 2016.

SEO, Y. S.; CHERN, M.; BARTLEY, L. E.; HAN, M.; JUNG, K. H.; LEE, I. et al. Towards establishment of a rice stress response interactome. **PLoS Genetics**, v. 7, 2011.

SHANMUGAM, V.; LO, J.; WU, C.; WANG, S.; LAI, C.; CONNOLLY, E. L.; HUANG, J.; YEH, K. Differential expression and regulation of iron-regulated metal transporters in *Arabidopsis halleri* and *Arabidopsis thaliana* – the role in zinc tolerance. **New Phytologist**, v. 190, 2011.

SIEDOW, J.N. Plant lipoxygenase: Structure and function. **Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, v. 42, p. 145-188, 1991.

SILVA, S.; PINTO, G.; DIAS, M. C.; CORREIA, C.M.; MOUTINHO-PEREIRA, J.; PINTO-CARNIDE, O.; SANTOS, C. Aluminium long-term stress differently affects photosynthesis in rye genotypes. **Plant Physiology Biochemistry**, v. 54, p. 105–112, 2012.

SILVA, S.; PINTO-CARNIDE, O.; MARTINS-LOPES, P.; MATOS, M.; GUEDES-PINTO, H.; SANTOS, C. Differential aluminium changes on nutrient accumulation and root differentiation in an Al sensitive vs. tolerant wheat. **Environmental and Experimental Botany**, v. 68, p. 91–98, 2010.

SILVA, S.; SANTOS, C.; MATOS, M.; PINTO-CARNIDE, O. Al toxicity mechanism in tolerant and sensitive rye genotypes. **Environmental and Experimental Botany**, v. 75, p. 89–97, 2012.

SINGH, S.; TRIPATHI, G. K.; SINGH, S.; SHARMA, S.; DUBEY, N. K.; CHAUHAN, D. K.; VACULÍK, M. Toxicity of aluminium on various levels of plant cells and organism: a review. **Environmental and Experimental Botany**, v. 137, p. 177–193, 2017.

SIVAGURU, M.; FUJIWARA, T.; SAMAJ, J.; BALUSKA, F.; YANG, Z.; OSAWA, H.; MAEDA, T.; MORI, T.; VOLKMANN, D.; MATSUMOTO, H. Aluminum-induced 1 \rightarrow 3-beta-D-glucan inhibits cell-to-cell trafficking of molecules through plasmodesmata. A new mechanism of aluminum toxicity in plants. **Plant Physiology**, v. 124, p. 991–1006, 2000.

SKIKNE B., HERSHKO C. Iron Deficiency. In: Anderson G., McLaren G. (eds) Iron Physiology and Pathophysiology in Humans. Nutrition and Health. **Humana Press**, 2012.

SOSBAI. **Arroz Irrigado: recomendações técnicas da pesquisa para o sul do Brasil**. Pelotas, SOSBAI, 2016.

SWEENEY, M.; THOMSON, M.; CHO, Y. G., PARK, Y.J.; WILLIAMSON, S.; et al. Global dissemination of a single mutation conferring white pericarp in rice. **PLoS Genetic**, v.3, e. 133, 2007.

TAKAHASHI M.; NAKANISHI, H.; KAWASAKI. S.; NISHIZAWA, N.K.; MORI, S. Enhanced tolerance of rice to low iron availability in alkaline soils using barley nicotianamine aminotransferase genes. **Nature Biotechnology**, v. 19, p. 466–469, 2001.

UENO, D.; ROMBOLA, A. D.; IWASHITA, T.; NOMOTO, K.; MA, J. F. Identification of two new phytosiderophores secreted by perennial grasses. **New Phytologist**, v. 174, p. 304–310, 2007.

VIGANI, G.; BRIAT, J.-F. Impairment of Respiratory Chain under Nutrient Deficiency in Plants: Does it Play a Role in the Regulation of Iron and Sulfur Responsive Genes? **Frontiers in Plant Science**, v. 6, 2016.

VON UEXKULL, H. R.; MUTERT, E. Global extent, development and economic-impact of acid soils. **Plant Soil**, v.171, p.1–15. 1995.

VON UEXKULL, L. V.; PIÑEROS, M. A.; HOEKENGA, O. A. The physiology, genetics and molecular biology of plant aluminium resistance and toxicity. **Plant Soil**, v. 274, p. 175–195, 2005.

WATERS, B. M.; MCINTURF, S. A.; STEIN, R. J. Rosette iron deficiency transcript and microRNA profiling reveals links between copper and iron homeostasis in *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Experimental Botany**, v. 63, p. 5903–5918, 2012.

WHO. The global prevalence of anaemia in 2011. **World Health Organization**, Geneva, 2015.

WHO. *Worldwide prevalence of anemia 1993-2005: WHO global data base on anemia*. **World Health Organization**, Geneva, 2008.

WU, K.; XIAO, S.; CHEN, Q. WANG, Q.; ZHANG, Y.; LI, K.; CHEN, L. Changes in the Activity and Transcription of Antioxidant Enzymes in Response to Al Stress in Black Soybeans. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 31, p. 141–150, 2012.

YADAVALLI, V.; NEELAM, S.; RAO, A. S.; REDDY, A. R.; SUBRAMANYAM, R. Differential degradation of photosystem I subunits under iron deficiency in rice. **Journal of Plant Physiology**, v. 169, p. 753–759, 2012.

YAMAJI, N.; HUANG, C. F.; NAGAO, S.; YANO, M.; SATO, Y.; NAGAMURA, Y.; MA, J. F. A Zinc Finger Transcription Factor ART1 Regulates Multiple Genes Implicated in Aluminum Tolerance in Rice. **The Plant Cell**, v. 21, p. 3339–3349, 2009.

YAMAMOTO, Y. Aluminum toxicity in plant cells: Mechanisms of cell death and inhibition of cell elongation. **Soil Science and Plant Nutrition**, v. 65, 2019.

YANG, J.; FAN, W.; ZHENG, S. Mechanisms and regulation of aluminum-induced secretion of organic acid anions from plant roots. **Journal of Zhejiang University-SCIENCE B (Biomedicine & Biotechnology)**, v. 20, p. 513–527, 2019

YOKOSHO, K.; YAMAJI, N.; MA, J. F. An Al-inducible MATE gene is involved in external detoxification of Al in rice. **The Plant Journal**, v. 68, p. 1061–1069, 2011.

YOKOSHO, K.; YAMAJI, N.; MA, J. F. Isolation and characterisation of two MATE genes in rye. **Functional Plant Biology**, v. 37, p. 296-303, 2010.

YOKOSHO, K.; YAMAJI, N.; UENO, D.; MITANI, N.; MA, J. F. OsFRDL1 Is a Citrate Transporter Required for Efficient Translocation of Iron in Rice. **Plant Physiology**, v. 149, p. 297–305, 2009.

YOKOSHO, K.; YAMAJI, N. E.; MA, J. F. Isolation and characterisation of two MATE genes in rye. **Functional Plant Biology**, v. 37, p. 296 – 303, 2010.

YOKOSHO, K.; YAMAJI, N.; UENO, D.; MITANI, N. E.; MA, J. F. *OsFRDL1* é um transportador de citrato necessário para a translocação eficiente de ferro no arroz. **Physiology vegetal**, v. 149, p. 297–305, 2009.

ZHAO, K.; WRIGHT, M.; KIMBALL, J.; EIZENGA, G.; MCCLUNG, A.; et al. Genomic

diversity and introgression in *O. sativa* reveal the impact of domestication and breeding on the rice genome. **PLoS ONE**, v. 5, e. 10780, 2010.

ZINDER, B; FURRER, G.; STUMM, W. The coordination chemistry of weathering: II. Dissolution of Fe(III) oxides. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v.5, 1996.