

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Agronomia



Tese

**Caracterização morfológica e análise da expressão gênica
em arroz (*Oryza sativa* L.) sob estresse por ferro**

Adriana Pires Soares Bresolin

Pelotas, 2010

Adriana Pires Soares Bresolin

**Caracterização morfológica e análise da expressão gênica
em arroz (*Oryza sativa* L.) sob estresse por ferro**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Ciências (área do conhecimento: Fitomelhoramento).

Orientador: Dr. Antônio Costa de Oliveira – FAEM/UFPel

Co-orientadores: Dr. Luciano Carlos da Maia – FAEM/UFPel

Dr. Rogério Oliveira de Sousa – FAEM/UFPel

Pelotas, 2010

Dados de catalogação na fonte:

(Marlene Cravo Castillo – CRB-10/744)

B676c Bresolin, Adriana Pires Soares

Caracterização morfológica e análise da expressão gênica em arroz(*Oryza sativa* L.)sob estresse por ferro / Adriana Pires Soares Bresolin; orientador Antônio Costa de Oliveira; co-orientadores Luciano Carlos da Maia e Rogério Oliveira de Sousa .- Pelotas, 2010.-143f.: il. - Tese (Doutorado) –Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel . Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2010.

1. *Oryza sativa* 2. Estresse abiótico 3. Variabilidade genética 4. Homeostase 5. Expressão diferencial I. Oliveira, Antônio Costa de (orientador) II .Título.

CDD 633.18

Banca Examinadora:

Dr. Antônio Costa de Oliveira – FAEM/UFPel (presidente)

Dr. Maurício Marini Kopp – Embrapa/CNPGL

Dr^a. Caroline Marques Castro - Embrapa /CPACT

Dr^a. Denise dos Santos Colares - Dep. de Bioquímica. UFPel

Aos meus pais

Antonio e Maria de Lourdes,

ao meu marido

Normando Ramsés Brescin

e ao meu filho

Pietro Soares Brescin

presentes em todos os momentos importantes da minha vida.

Dedico

Agradecimentos

A Deus, pela vida, saúde e proteção.

Ao meu marido e companheiro pelo amor e compreensão. E ao meu amado filho, meu maior presente e estímulo.

Ao meu orientador prof. Antonio Costa de Oliveira pela oportunidade e confiança. Além disso, pela generosidade na transmissão dos conhecimentos e pela relação de respeito e amizade desenvolvida ao longo destes seis anos de convivência.

Ao grande mestre prof. Fernando Irajá Felix Carvalho pelos valiosos ensinamentos, oportunidade e incentivo. Aos meus co-orientadores prof. Luciano Carlos da Maia e Rogério Oliveira de Sousa, pela transmissão de conhecimentos e incentivo constante.

Aos pesquisadores da Embrapa Clima Temperado, Ariano Martins de Magalhães Jr. e Caroline Marques Castro e as professoras Andréa Miyasaka de Almeida da UFV e Denise dos Santos Colares da UFPel pelo apoio e importante contribuição.

Aos colaboradores Roberto Carlos Doring Wolter do Departamento de Solos, pelo auxílio nas análises dos micronutrientes. E Roberta Manica Berto do Departamento de Fitossanidade pelos esclarecimentos estatísticos.

Aos colegas e amigos, Claudete Mistura, Juliana Castelo Branco, Naciele Marini, Renata Juliana Ahlert e Daniel da Rosa Farias pelo constante incentivo e contribuição no desenvolvimento deste trabalho.

A todos os demais colegas do CGF, Camila Pegoraro, Carla Ferreira Silveira, Gabriela de M. da Fonseca, Glacy Jaqueline da Silva, Felipe Victoria, Lara Dias, Maraisa Crestani, Sidney Kavalco, Taciane Finatto, Tatiane Medeiros de Souza, Thaís Raquel Hagemann e Viviane Kopp da Luz, pelos agradáveis momentos de convivência e troca de experiências.

Ao Programa de Pós-graduação em Agronomia/FAEM-UFPel, pela oportunidade de realização do curso. A CAPES, pela viabilização financeira deste projeto.

Por fim, agradeço a todos aqueles que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho.

Resumo

SOARES_BRESOLIN, ADRIANA PIRES. **Caracterização morfológica e análise da expressão gênica em arroz (*Oryza sativa* L.) sob estresse por ferro**. 2010. 143f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

A toxidez por ferro é um dos mais importantes estresses abióticos a limitar a produção de arroz irrigado em nível mundial. Este estudo foi realizado com o objetivo de caracterizar genótipos de arroz irrigado quanto a tolerância ao estresse por Fe^{2+} sob condições controladas, viabilizando o sistema de cultivo hidropônico para esta finalidade. Além disso, analisar o perfil de expressão de genes envolvidos na homeostase do metal em plantas, através da técnica de qRT-PCR. Foi verificada a interferência da utilização do agente quelante (EDTA) na caracterização dos genótipos; analisado o efeito do tempo de exposição a toxidez (0, 3, 6, 9 e 12 dias) sob o crescimento das plântulas; caracterizados genótipos de arroz (BRS-Agrisul, Epagri 108, BR-IRGA 409, BR-IRGA 410 e Nipponbare) quanto a tolerância a toxidez por Fe^{2+} e por fim realizada a análise de expressão dos genes *OsFDRL1*, *OsNRAMP1* e *OsNRAMP2* nos tempos 0; 6; 12; 18 e 24h sob estresse por Fe^{2+} . Foi verificado que o Fe^{2+} na sua forma livre sem Na_2EDTA é acumulado em maior concentração na parte aérea de plântulas de arroz do que quando este se apresenta quelado na forma de Fe-EDTA. A toxidez por ferro interferiu negativamente sobre o desenvolvimento do CR e CPA, sendo o CR a variável mais afetada. O aumento do tempo de estresse resultou no incremento do acúmulo de ferro na parte aérea das plântulas. O sistema hidropônico demonstrou eficiência na caracterização de genótipos quanto a tolerância a toxidez por ferro. Genótipos caracterizados como sensíveis a toxidez por ferro neste estudo, BR-IRGA 409 e Nipponbare foram os que apresentaram o maior acúmulo de Fe^{2+} na parte aérea. Genótipos caracterizados como moderadamente tolerantes e tolerantes também acumularam elevados teores do íon metálico. O aumento do acúmulo de Fe^{2+} nos tecidos sob condição de excesso do íon na solução apresentou correlação com o aumento de Zn e Mn nestes mesmos tecidos. Constituições genéticas contrastantes quanto a tolerância a toxidez por ferro apresentam expressão diferencial dos genes *OsFDRL1*, *OsNRAMP1* e *OsNRAMP2* envolvidos na homeostase do metal.

Palavras-chave: estresse abiótico, variabilidade genética, homeostase e expressão diferencial.

Abstract

SOARES_BRESOLIN, ADRIANA PIRES. Morphological characterization and gene expression analysis in rice (*Oryza sativa* L.) under iron stress. 2010. 143f. Thesis (Doctorate) – Graduate Program in Agronomy. Federal University of Pelotas, Pelotas.

Iron toxicity is one of the most important abiotic stresses limiting irrigated rice production worldwide. This study was performed with the goal of characterizing irrigated rice genotypes regarding Fe^{2+} stress tolerance under controlled conditions, using a hydroponic system. Furthermore, to analyse the expression profile of genes involved in iron homeostasis in plants, using quantitative PCR (qRT-PCR). The genotypes used were BRS-Agrisul, Epagri 108, BR-IRGA 409, BR-IRGA 410 and Nipponbare. An interference of the chelating agent (EDTA) was observed on the genotype characterization; when exposed to 0, 3, 6, 9 and 12 days of stress. The expression of genes *OsFDRL1*, *OsNRAMP1* and *OsNRAMP2* was measured at 0; 6; 12; 18 and 24h under Fe^{2+} stress. It was observed that Fe^{2+} in its free form without Na_2EDTA , is accumulated in higher concentrations in the shoots of rice seedlings when compared to its chelated form (Fe-EDTA). Iron toxicity interfered negatively on the development of root length (RL) and shoot length (SL), being RL the variable that was most affected. Stress period increases led to iron accumulation in the shoots. The hydroponic system was efficient to allow discrimination between iron tolerant and sensitive genotypes. Iron sensitive genotypes observed in this study were BR-IRGA 409 and Nipponbare, which were those with higher iron accumulation in the shoots. Medium tolerant and tolerant genotypes also accumulated iron in the shoots. The increase in Fe^{2+} accumulation in the tissues under high iron stress was correlated with increased contents of Zn and Mn in the same tissues. Contrasting genotypes regarding iron tolerance showed differential expression of iron homeostasis genes *OsFDRL1*, *OsNRAMP1* and *OsNRAMP2*.

Key words: abiotic stress, genetic variability, homeostasis and differential expression.

Lista de Figuras

Capítulo III. Efeito do tempo de exposição a toxidez por ferro sobre o crescimento de plântulas de arroz em cultivo hidropônico

- Figura 1** Regressões ajustadas para a variável dependente teor de ferro (Fe) dos genótipos de arroz irrigado BRS-Agrisul, Epagri 108, Nipponbare e BR-IRGA 410, avaliados nos tratamentos controle (0.56 mg L^{-1} de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) e tratamento com Fe (500 mg L^{-1} de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) em cinco tempos sob estresse (0; 3; 6, 9 e 12 dias) em solução nutritiva. FAEM/UFPel-CGF, 2010.....89
- Figura 2** Regressões ajustadas para a variável dependente comprimento de parte aérea (CPA) dos genótipos de arroz irrigado BRS-Agrisul, Epagri 108, Nipponbare e BR-IRGA 410, avaliados nos tratamentos controle (0.56 mg L^{-1} de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) e tratamento com Fe (500 mg L^{-1} de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) em cinco tempos sob estresse (0; 3; 6, 9 e 12 dias) em solução nutritiva. FAEM/UFPel-CGF, 2010.....90
- Figura 3** Regressões ajustadas para a variável dependente comprimento de raiz (CR) dos genótipos de arroz irrigado BRS-Agrisul, Epagri 108, Nipponbare e BR-IRGA 410, avaliados nos tratamentos controle (0.56 mg L^{-1} de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) e tratamento com Fe (500 mg L^{-1} de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) em cinco tempos sob estresse (0; 3; 6, 9 e 12 dias) em solução nutritiva. FAEM/UFPel-CGF, 2010.....92

Capítulo IV. Caracterização de genótipos de arroz irrigado quanto a tolerância ao estresse por excesso de ferro em condições hidropônicas

Figura 1	Concentração de ferro (Fe) na parte aérea de cinco genótipos de arroz, submetidos a condição controle ou normal (T1 = solução nutritiva padrão com 2 mg L ⁻¹ de FeSO ₄ .7H ₂ O) e condição de estresse (T2 = 2000 mg L ⁻¹ de FeSO ₄ .7H ₂ O).....	105
Figura 2	Concentração dos micronutrientes: Cobre (Cu), Zinco (Zn) e Manganês (Mn), na parte aérea de cinco genótipos de arroz, submetidos a condição controle ou normal (T1 = solução nutritiva padrão com 2 mg L ⁻¹ de FeSO ₄ .7H ₂ O) e condição de estresse (T2 = 2000 mg L ⁻¹ de FeSO ₄ .7H ₂ O).....	106
Figura 3	Comprimento de parte aérea (CPA) de cinco genótipos de arroz, submetidos a condição controle ou normal (T1 = solução nutritiva padrão com 2 mg L ⁻¹ de FeSO ₄ .7H ₂ O) e condição de estresse (T2 = 2000 mg L ⁻¹ de FeSO ₄ .7H ₂ O).....	107
Figura 4	Sintomas visuais de toxidez por ferro (a, b e c), observados em folhas de plântulas de arroz após 3 dias sob condição de estresse (2000 mg L ⁻¹ de FeSO ₄ .7H ₂ O).....	111
Figura 5	Comportamento dos genótipos A (Epagri 108) e B (BR-IRGA 409) observados no tratamento controle (solução nutritiva padrão com 2 mg L ⁻¹ de FeSO ₄ .7H ₂ O) e de Fe ²⁺ (2000 mg L ⁻¹ de FeSO ₄ .7H ₂ O).....	111

Capítulo V. Análise da expressão dos genes *OsFRDL1*, *OsNRAMP1* e *OsNRAMP2*, em genótipos de arroz contrastantes quanto à tolerância ao estresse por ferro

Figura 1	Regressões ajustadas para a variável dependente ΔCt (Ct do gene alvo - Ct do gene de referência, <i>UBQ5</i>) em relação ao logaritmo das diluições de cDNA de raiz e parte aérea, do genótipo controle BR-IRGA 410, no tempo 0h de exposição ao Fe ²⁺ , analisadas em qRT-PCR em tempo real. FAEM/UFPEL, 2010.....	127
Figura 2	Perfil de expressão dos genes <i>OsFRDL1</i> (em parte aérea e raiz), <i>OsNRAMP1</i> (em raiz) e <i>OsNRAMP2</i> (em parte aérea). Analisado em cinco tempos de exposição ao estresse for Fe ²⁺ (0; 6; 12, 18 e 24 horas), em três genótipos de	

arroz irrigado (Epagri 108, BR-IRGA 410 e Nipponbare), através da técnica de *qRT-PCR* e representado por uma escala de 1 - 40, utilizando o *Mult Experiment Viewer* (TIGR MeV) (SAEED et al., 2003). Uma extremidade da escala representada pela cor verde claro indica o menor nível de expressão do gene e a outra extremidade representada pela cor vermelha claro, indica o maior nível de expressão. FAEM/UFPeI, 2010.....128

Figura 3 Dispersão gráfica dos genótipos Epagri 108 (G1), BR-IRGA 410 (G2) e Nipponbare (G3), utilizando-se os dois primeiros componentes principais (CP1 e CP2) para variáveis dependentes (*OsNRAMP1*, *OsNRAMP2* e *OsFRDL1*), com base em análises de expressão de *qRT-PCR*. FAEM/UFPeI, 2010.....134

Lista de Tabelas

Capítulo II. Interferência da utilização do agente quelante (EDTA) na caracterização de genótipos de arroz quanto à tolerância ao ferro em solução nutritiva

Tabela 1	Resumo da análise da variância, para os caracteres matéria seca da parte aérea (MSPA) e matéria seca de raiz (MSR) em mg kg^{-1} ; comprimento de parte aérea (CPA) e comprimento de raiz (CR) em cm; teor de cobre (Cu), zinco (Zn), manganês (Mn) e de ferro (Fe) em mg kg^{-1} , de quatro genótipos de arroz irrigado avaliados nos tratamentos normal (T1 = solução nutritiva com 0.56 mg L^{-1} de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), tratamento Fe s/ Na_2EDTA (T2 = 390 mg L^{-1} de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) e tratamento de Fe c/ Na_2EDTA (T3 = 390 mg L^{-1} de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ mais Na_2EDTA), em solução hidropônica. FAEM/UFPel-CGF, 2010.....	71
Tabela 2	Comparação de médias, para os caracteres matéria seca da parte aérea (MSPA) e matéria seca de raiz (MSR) em mg kg^{-1} ; comprimento de parte aérea (CPA) e comprimento de raiz (CR) em cm; teor de cobre (Cu), zinco (Zn), manganês (Mn) e de ferro (Fe) em mg kg^{-1} , de quatro genótipos de arroz irrigado avaliados nos tratamentos normal (T1 = solução nutritiva com 0.56 mg L^{-1} de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), tratamento Fe s/ Na_2EDTA (T2 = 390 mg L^{-1} de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) e tratamento de Fe c/ Na_2EDTA (T3 = 390 mg L^{-1} de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ mais Na_2EDTA), em solução hidropônica. FAEM/UFPel-CGF, 2010.....	72
Tabela 3	Concentração de micronutrientes na parte aérea dos 4 genótipos de arroz após 7 dias nos tratamentos: Normal ($0,56 \text{ mg L}^{-1}$ de Fe^{2+}), Fe^{2+} s/EDTA (390 mg L^{-1} de Fe^{2+}) e Fe^{2+} c/EDTA (390 mg L^{-1} de Fe^{2+}). FAEM/UFPel-CGF, 2010.....	73

Tabela 4	Coeficiente de Correlação de Pearson entre as variáveis: matéria seca da parte aérea (MSPA) e matéria seca de raiz (MSR) em mg kg ⁻¹ ; comprimento de parte aérea (CPA) e comprimento de raiz (CR) em cm; teor de cobre (Cu), zinco (Zn), manganês (Mn) e de ferro (Fe) em mg kg ⁻¹ , de quatro genótipos de arroz irrigado avaliados nos tratamentos normal (T1 = solução nutritiva com 0.56 mg L ⁻¹ de FeSO ₄ .7H ₂ O), tratamento Fe s/ Na ₂ EDTA (T2 = 390 mg L ⁻¹ de FeSO ₄ .7H ₂ O) tratamento de Fe c/ Na ₂ EDTA (T3 = 390 mg L ⁻¹ de FeSO ₄ .7H ₂ O mais Na ₂ EDTA) em solução hidropônica. FAEM/UFPel-CGF, 2010.....	74
-----------------	---	----

Capítulo III. Efeito do tempo de exposição a toxidez por ferro sobre o crescimento de plântulas de arroz em cultivo hidropônico

Tabela 1	Resumo da análise da variância, para as variáveis: comprimento de parte aérea (CPA) e comprimento de raiz (CR) em cm, e teor de ferro (Fe) em mg kg ⁻¹ , de quatro genótipos de arroz irrigado avaliados nos tratamentos controle (T1 = solução nutritiva com 0.56 mg L ⁻¹ de FeSO ₄ .7H ₂ O) e tratamento com Fe (T2 = 500 mg L ⁻¹ de FeSO ₄ .7H ₂ O) em cinco tempos de avaliação (0; 3; 6, 9 e 12 dias) em solução nutritiva. FAEM/UFPel-CGF, 2010.....	87
-----------------	---	----

Tabela 2	Coeficiente de Correlação de Pearson entre as variáveis: comprimento de parte aérea (CPA), comprimento de raiz (CR) e teor de ferro (Fe), de quatro genótipos de arroz irrigado avaliados nos tratamentos: controle (T1 = solução nutritiva com 0.56 mg L ⁻¹ de FeSO ₄ .7H ₂ O) e tratamento com Fe (T2 = 500 mg L ⁻¹ de FeSO ₄ .7H ₂ O) em cinco tempos (0; 3; 6, 9 e 12 dias) sob condição hidropônica. FAEM/UFPel-CGF, 2010.....	93
-----------------	---	----

Capítulo IV. Caracterização de genótipos de arroz irrigado quanto a tolerância ao estresse por excesso de ferro em condições hidropônicas

Tabela 1	Resumo da análise da variância, para as variáveis; teor de ferro (Fe), cobre (Cu), zinco (Zn) e manganês (Mn) em mg kg ⁻¹ , comprimento de parte aérea (CPA) e comprimento de raiz (CR) em cm, de cinco genótipos de arroz irrigado avaliados nos tratamentos controle (T1 = solução nutritiva padrão com 2 mg L ⁻¹ de FeSO ₄ .7H ₂ O), tratamento de estresse (T2 = 2000 mg L ⁻¹ de FeSO ₄ .7H ₂ O), em solução hidropônica. FAEM/UFPel-CGF, 2010.....	104
-----------------	--	-----

Tabela 2	Coeficiente de Correlação de Pearson entre as variáveis: teor de ferro (Fe), cobre (Cu), zinco (Zn) e manganês (Mn) em mg kg ⁻¹ , comprimento de parte aérea (CPA) e comprimento de raiz (CR) em cm, de cinco genótipos de arroz irrigado avaliados nos tratamentos controle (T1 = solução nutritiva padrão com 2 mg L ⁻¹ de FeSO ₄ .7H ₂ O), tratamento de estresse (T2 = 2000 mg L ⁻¹ de FeSO ₄ .7H ₂ O), em solução hidropônica. FAEM/UFPeI-CGF, 2010.....	108
-----------------	--	-----

Tabela 3	Sintomas visuais avaliados em cinco genótipos de arroz irrigado sob os tratamentos: controle (T1 = solução nutritiva padrão com 2 mg L ⁻¹ de FeSO ₄ .7H ₂ O), tratamento de estresse (T2 = 2000 mg L ⁻¹ de FeSO ₄ .7H ₂ O), em solução hidropônica. As graduações obedecem a uma escala variável de 0 a 9, adaptada do Standard Evaluation System for Rice utilizada pelo IRRI. FAEM/UFPeI-CGF, 2010.....	110
-----------------	---	-----

Capítulo V. Análise da expressão dos genes *OsFRDL1*, *OsNRAMP1* e *OsNRAMP2*, em genótipos de arroz contrastantes quanto à tolerância ao estresse por ferro

Tabela 1	Informações referentes aos genes e suas sequências de iniciadores utilizados nas análises de qRT-PCR, obtidos junto ao banco de dados do RAP-DB (Rice Annotation Project Database), 2010.....	124
-----------------	---	-----

Tabela 2	Resultados do experimento de validação dos genes <i>OsFRDL1</i> , <i>OsNRAMP1</i> e <i>OsNRAMP2</i> em relação ao padrão de referência <i>UBQ5</i> , realizada a partir de diluições seriadas de cDNA do genótipo BR-IRGA 410 no tempo 0h de exposição ao Fe ²⁺ . FAEM/UFPeI, 2010.....	126
-----------------	--	-----

Tabela 3	Coeficiente de Correlação de Pearson entre as variáveis: <i>OsFRDL1</i> , <i>OsNRAMP1</i> e <i>OsNRAMP2</i> , considerando três genótipos de arroz irrigado (Epagri 108, BR-IRGA 410 e Nipponbare), avaliados em cinco tempos de exposição ao estresse por Fe ²⁺ (0; 6; 12, 18 e 24 horas), através da análise de qRT-PCR em tempo real. FAEM/UFPeI-CGF, 2010.....	132
-----------------	--	-----

Tabela 4	Autovetores correspondentes aos dois componentes principais (CP 1 e CP 2) para as variáveis: <i>OsFRDL1</i> , <i>OsNRAMP1</i> e <i>OsNRAMP2</i> , considerando três genótipos de arroz irrigado (Epagri 108, BR-IRGA 410 e Nipponbare), avaliados em cinco tempos de exposição ao estresse por Fe ²⁺ (0; 6; 12, 18 e 24 horas), através da análise de qRT-PCR em tempo real. FAEM/UFPel-CGF, 2010.....	133
-----------------	---	-----

Sumário

Agradecimentos.....	4
Resumo.....	5
Abstract.....	6
Lista de Figuras.....	7
Lista de Tabelas.....	12
1. Introdução geral.....	17
2. Capítulo I. Revisão bibliográfica.....	19
2.1 A cultura do arroz.....	19
2.2 Classificação botânica, origem e domesticação.....	20
2.3 Genoma modelo.....	22
2.4 Melhoramento genético.....	23
2.5 Mecanismos moleculares.....	26
2.6 Solos hidromórficos do Sul do Brasil.....	27
2.7 Ferro no solo.....	27
2.8 Importância do ferro na nutrição das plantas.....	28
2.9 Absorção de ferro pelas plantas.....	29
2.10 Toxidez por excesso de ferro.....	31
2.11 Controle da toxidez.....	33
2.12 Transporte de ferro na planta.....	35
2.13 Armazenamento de ferro na planta.....	41
2.14 Referências bibliográficas.....	44
3. Capítulo II. Interferência da utilização do agente quelante (EDTA) na caracterização de genótipos de arroz quanto à tolerância ao ferro em solução nutritiva.....	61

3.1 Introdução.....	61
3.2 Material e métodos.....	67
3.3 Resultados e discussão.....	68
3.4 Conclusões.....	74
3.5 Referências bibliográficas.....	75
4. Capítulo III. Efeito do tempo de exposição a toxidez por ferro sobre o crescimento de plântulas de arroz em cultivo hidropônico.....	82
4.1 Introdução.....	81
4.2 Material e métodos.....	84
4.3 Resultados e discussão.....	85
4.4 Conclusões.....	93
4.5 Referências bibliográficas.....	94
5. Capítulo IV. Caracterização de genótipos de arroz irrigado quanto a tolerância ao estresse por excesso de ferro em condições hidropônicas.....	98
5.1 Introdução.....	98
5.2 Material e métodos.....	101
5.3 Resultados e discussão.....	103
5.4 Conclusões.....	112
5.5. Referências bibliográficas.....	112
6. Capítulo V. Análise da expressão dos genes <i>OsFRDL1</i> , <i>OsNRAMP1</i> e <i>OsNRAMP2</i> , em genótipos de arroz contrastantes quanto à tolerância ao estresse por ferro.....	117
6.1 Introdução.....	117
6.2 Material e métodos.....	120
6.3 Resultados e discussão.....	125
6.4 Conclusões.....	135
6.5 Referências bibliográficas.....	135
7. Considerações Finais.....	139
8. Referências bibliográficas Item 1.....	140
9 VITAE.....	143

1. INTRODUÇÃO GERAL

O arroz (*Oryza sativa* L.) é um dos alimentos mais importantes para a nutrição humana e o principal alimento para mais da metade da população mundial, desempenhando importante papel tanto em âmbito social e econômico quanto cultural. Sendo atualmente o segundo cereal mais produzido no mundo (FAO, 2010), o arroz apresenta papel de destaque no Brasil, o 1º país fora da Ásia em produção e consumo de arroz. Na safra de 2009/2010 a produção, segundo o sexto levantamento de grãos ficou em 11,5 milhões de toneladas. O Estado do Rio Grande do Sul tem uma importância fundamental neste contexto, sendo o principal produtor de arroz irrigado do País (CONAB, 2010). No Estado, o cultivo irrigado representa a principal e mais produtiva forma de cultivo de arroz. No Estado, o cultivo irrigado representa a principal e mais produtiva forma de cultivo de arroz. No entanto, em virtude da inundação do solo como requer o sistema irrigado, somado à principal característica de solos do tipo hidromórfico que é a drenagem natural deficiente e a elevados teores de ferro provenientes de um material de origem rico no mineral (BRASIL, 1973), freqüentemente observa-se um aumento da disponibilidade de Fe^{2+} na solução do solo a níveis que podem ser tóxicos as plantas cultivadas nestas condições (BECANA et al., 1998).

A toxidez por ferro é um dos mais importantes estresses abióticos a limitar a produção de arroz irrigado em nível mundial (DOBERMANN; FAIRHURST, 2000; WARDA, 2001), podendo levar a perdas consideráveis na produção que podem representar até 100% de redução no rendimento dependendo do nível da toxidez e da tolerância dos cultivares de arroz (BENCKISER et al., 1982; SAHRAWAT; DIATTA, 1996; AUDEBERT; SAHRAWAT, 2004). De acordo com Bacha (1993), nas condições brasileiras as reduções na produtividade podem chegar a 80%. No Rio Grande do Sul segundo o Instituto Rio-Grandense do Arroz, esta redução pode alcançar até 20% (IRGA, 2004). No entanto, a exploração do potencial genético é uma alternativa para a produção da cultura em solos com potencial de ocorrência de toxidez por ferro (FAGERIA et al., 2003), sendo a característica de tolerância

sistematicamente avaliada nas constituições genéticas em programas de melhoramento (VAHL, 1991). Visando evitar os efeitos da toxicidade por ferro em lavouras de arroz irrigado tem sido realizada a seleção de genótipos que apresentem variabilidade para o caráter (MAGALHÃES JR. et al., 2007).

Diversos estudos já demonstraram que variedades de arroz diferem amplamente quanto aos níveis de tolerância à toxidez por ferro (SAHRAWAT, 2004) e quanto a outros estresses abióticos, seja através de métodos convencionais de melhoramento (AKBAR et al., 1987; GUNAWARDENA et al., 1982; MAHADEVAPPA et al., 1991; SAHRAWAT et al., 1996, MAGALHÃES JR. et al., 2005, 2007; CRESTANI et al., 2009) ou através do uso da biotecnologia (WU et al., 1998; BENNETT, 2001; SHIMIZU et al., 2005; WISSUWA, 2005).

O efeito tóxico causado pelo excesso de Fe^{2+} pode se manifestar em uma ampla diversidade de ambientes (BECKER; ASCH, 2005), o que torna essencial um entendimento mais aprofundado de todos os mecanismos de homeostase do metal, envolvendo os processos fisiológicos básicos de absorção, transporte e armazenamento do mesmo na planta (GRUSAK, 2002; GROSS et al., 2003; COLANGELO; GUERINOT, 2006). De acordo com Gross et al. (2003), várias famílias gênicas estão envolvidas na homeostase do ferro em plantas. Estes genes têm sido estudados em várias espécies e importantes avanços já foram feitos, buscando a elucidação dos mecanismos de resposta a esse estresse. No entanto, devido à grande complexidade destes mecanismos, muito ainda precisa ser feito no intuito de elucidar todos os eventos, tanto fisiológicos quanto moleculares, envolvidos na resposta de tolerância do arroz à toxidez por Fe^{2+} .

Considerando a necessidade e a importância do estudo da tolerância ao estresse por ferro em arroz, este trabalho teve como objetivo caracterizar genótipos de arroz quanto à tolerância a toxidez por ferro e analisar a expressão de genes envolvidos na homeostase do metal nestes genótipos, visando à elucidação destes mecanismos.

2. CAPÍTULO I

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A cultura do arroz

O arroz (*Oryza sativa* L.) é o cereal mais importante em nível mundial, considerando os aspectos sociais, econômicos e culturais. De acordo com a Organização Mundial de Alimentação e Agricultura (FAO) é um dos alimentos mais importantes para a nutrição humana e o principal alimento para mais da metade da população do mundo, desempenhando papel fundamental não apenas na luta contra a fome, mas também na contribuição para a geração de emprego e renda a bilhões de pessoas. Para os povos da Ásia, em particular, o arroz além de principal fonte de calorias é uma importante fonte de renda e de emprego, moldando a formação das sociedades e culturas. Na América Latina, o arroz constitui um produto básico na dieta da população, sendo, depois do açúcar, a segunda maior fonte de calorias diárias (FAO, 2010).

No contexto mundial o arroz encontra-se em segundo lugar como cereal mais cultivado, com uma produção em torno de 650 milhões de toneladas. O milho apresenta-se no topo da lista com uma produção média de 700 milhões de toneladas, e em terceiro lugar o trigo com uma média de 600 milhões de toneladas (FAO, 2010).

Atualmente, cerca de 90% do arroz mundial é produzido e consumido nos países asiáticos. O Brasil também se destaca por sua importante participação no fornecimento do produto, tanto ao mercado interno quanto ao externo, sendo o 1º país fora da Ásia em produção e consumo de arroz (IRGA, 2010). O consumo no país para a safra de 2009/2010, segundo estimativas da CONAB (2010), será de 12,5 milhões de toneladas ao passo que a estimativa para a produção no sexto

levantamento de grãos ficou em 11,5 milhões de toneladas, sendo o déficit entre consumo e produção compensado pela importação e estoque de passagem.

A lavoura de arroz vem apresentando incremento em produtividade embora a expansão da área encontre dificuldades pela falta de terras apropriadas à cultura, principalmente para utilização com irrigação, uma vez que a maior parcela da produção de arroz vem do cultivo irrigado (CONAB, 2010). Este cenário sintetiza claramente o papel de destaque exercido pelo arroz na agricultura brasileira.

O Rio Grande do Sul tem uma importância fundamental na produção de arroz do Brasil e MERCOSUL, ocupando uma área semeada de 1,084 milhões de hectares (safra 2009/10). A produtividade média de arroz no Estado supera 7,2 t/ha, contra uma média de 2,3 t/ha no País. Na safra 2008/09 a produção registrada foi superior a oito milhões de toneladas, respondendo por cerca de 63% do arroz irrigado produzido no Brasil (CONAB, 2010).

O crescente aumento e desenvolvimento da população mundial têm implicado em maior demanda de produção e alta qualidade do arroz produzido. Em contrapartida, a produção da cultura enfrenta muitas restrições, entre elas a escassez de água, terra e mão-de-obra, além de estresses bióticos e abióticos. Para enfrentar o desafio de produzir mais arroz com esses condicionantes, precisamos de novas tecnologias que agrupem biotecnologia e melhoramento convencional.

A utilização de ferramentas biotecnológicas na exploração do potencial genético das plantas possibilita a descoberta de cultivares de arroz com maior potencial de rendimento, maior estabilidade de produção e adaptabilidade às mudanças climáticas globais, além de resistência durável a moléstias e insetos e tolerância a estresses abióticos (frio, seca, salinidade, toxidez por ferro, alumínio, ácidos orgânicos), entre outros.

2.2 Classificação botânica, origem e domesticação

O arroz é uma planta herbácea, anual e aquática ou hidrófila. Pertence à divisão das angiospermas, grupo das monocotiledôneas, família *Poaceae*, tribo *Oryzea*, e gênero *Oryza* (NCBI TAXONOMY, 2009). O nome científico *Oryza* foi dado por Linnaeus à planta e vem de um termo grego muito antigo, designativo do arroz. Esse termo provém do árabe ou do chinês e significa “bom grão da vida” (BOTELHO, 1914). A tribo *Oryzae*, que contém o gênero *Oryza*, é composta por 23

espécies (VAUGHAN; CHANG, 1995); destas, apenas duas são cultivadas, *Oryza sativa* L. (arroz cultivado asiático) e *Oryza glaberrima* Steud. (arroz cultivado africano).

A espécie *Oryza sativa* é mais difundida mundialmente devido sua importância na alimentação humana. Ambas as espécies cultivadas são diplóides com número básico de cromossomos (x) igual a 12 ($2n=24$), porém existem espécies poliplóides com $2n = 48$. As duas espécies cultivadas e seus respectivos ancestrais possuem o mesmo genoma A, pois seus híbridos não apresentaram nenhum distúrbio cromossômico significativo (MORISHIMA et al., 1992). Apesar da grande semelhança, existem diferenças entre seus genomas e, assim, o de *O. sativa* foi representado por AA e do *O. glaberrima* por AgAg. Ainda, as duas espécies são predominantemente autógamas (TERRES et al., 1998). Três subespécies de *O. sativa* estão descritas atualmente, sendo *indica* e *japonica* as mais cultivadas, seguidas pela terceira subespécie conhecida como *javanica* ou *japonica tropical* (LONDO et al., 2006).

O Sudeste Asiático, mais precisamente a região compreendida entre a Índia e Mianmar (antiga Birmânia), tem sido referido como o centro de origem do arroz asiático (*Oryza sativa*), em virtude da grande diversidade de formas cultivadas desse arroz ali encontrada (GRIST, 1978; PEREIRA, 2002). De acordo com alguns historiadores, sua origem e domesticação deram-se provavelmente no sul da Índia, onde se encontram as condições de solo mais favoráveis para o seu cultivo. Escritos indianos de 1300 e 1000 a.C. descrevem certas práticas agrônômicas, como o transplante, e exibem uma classificação agrônômica e alimentícia do arroz (MAGALHÃES JR e COSTA de OLIVEIRA, 2008).

A distribuição bastante abrangente dos parentes silvestres do arroz na África, no Sul e Sudeste da Ásia e nas Américas do Sul e Central sugerem a existência de um ancestral comum nas regiões do supercontinente *Godwana*, antes da deriva dos continentes. Atualmente, é admitido que o arroz propagou-se desde o sudeste asiático e a Índia, até a China, cerca de 3 mil anos a.C. Foram identificados na China os mais antigos resquícios de grãos de arroz encontrados no vale do Rio Yang-Tsé-Kiang, e datados do período compreendido entre 3395 e 2000 a.C (CHANG, 1976 b). O que não significa, no entanto, que seu cultivo não era praticado antes dessa época (PEREIRA, 2002).

Estudos utilizando marcadores moleculares apontam a espécie *Oryza rufipogon* encontrado na China, como o ancestral comum que originou as subespécies *japonica* e *javanica*, presumindo que o centro de origem do arroz possa ter sido a China (BAUTISTA et al., 2001). Segundo Pereira (2002), é estimado que o cultivo do arroz na China antecedeu pelo menos mil anos o da Índia. Da China, o arroz foi introduzido na Coreia e, posteriormente, no Japão. A partir da Índia, o arroz chegou ao Ceilão, onde foi cultivado inicialmente no sistema de sequeiro (MAGALHÃES JR; COSTA de OLIVEIRA, 2008). A introdução de *O. sativa* na Ásia Ocidental e Mediterrâneo ocorreu durante o Império Persa. Da Pérsia expandiu-se para o Turquistão e depois à Mesopotâmia à Arábia (SILVA, 1956). Pelos árabes foi levado para o delta do Rio Nilo, no Egito, para a costa oriental africana e, em seguida para o Marrocos e Espanha (TERRES et al., 1998), de onde se espalhou para os países vizinhos. O arroz somente chegou a Espanha e a Sicília por volta de 883 d.C. De Sevilha disseminou-se para o sul da Espanha, para a Itália e para Portugal. Foi introduzido na América pelos espanhóis e, no Brasil, pelos portugueses, no início do século 16, onde se tornou um dos principais alimentos de consumo interno (MAGALHÃES JR; COSTA de OLIVEIRA, 2008).

2.3 Genoma modelo

O arroz (*Oryza sativa* L.) subsp. *japonica* cv. Nipponbare teve seu genoma completamente seqüenciado no ano de 2005, em virtude da mobilização de grandes grupos de pesquisa distribuídos por todo o mundo que constituíram o Projeto Internacional de Seqüenciamento do Genoma do Arroz (IRGSP- International Rice Genome Sequencing Project). Esta iniciativa foi o primeiro passo para inúmeros avanços na área da biotecnologia vegetal, que adquiriu uma importante ferramenta para o desenvolvimento de pesquisas inéditas utilizando um genoma modelo entre as poáceas. Esta espécie foi a eleita entre os cereais para ser seqüenciada por apresentar um genoma consideravelmente pequeno (389 Mb) quando comparado a outros cereais de importância econômica como milho, cevada e trigo, com genomas de 2.500 Mb, 4.900 Mb e 16.000 Mb, respectivamente, e por apresentar importantes relações de sintonia com as demais espécies de cereais, sendo que um total de 2.859 genes parecem ser exclusivos ao genoma do arroz e outros cereais. Estas relações de colinearidade aliadas a outras ferramentas biotecnológicas permitem

algumas generalizações sobre as estruturas destes genomas (IRGSP, 2005), tornando-se a primeira cultura alimentar para a qual a seqüência completa dos genes está disponível.

Estudos de genômica comparativa entre alguns cereais como milho, trigo, arroz, milheto e sorgo, evidenciaram notável conservação do conteúdo genético e de genes entre estas espécies. Estas evidências de sintonia ou colinearidade permitem a transferência de informações genéticas entre eles, beneficiando as espécies menos favorecidas tecnologicamente (MOORE et al., 1995; KELLOGG, 2001; ILIC et al., 2003; MA et al., 2005; DEVOS, 2005; VARSHNEY et al., 2006). Com o término do seqüenciamento do genoma do arroz pôde ser evidenciado que entre os 37.544 genes preditos na espécie, 90% deles contém genes homólogos em *Arabidopsis* (IRGSP, 2005). Estas regiões conservadas possuem conteúdos providos por sucessões chamadas de homólogas, que foram herdadas de um antepassado comum; entretanto, algumas regiões apresentam diferenças, constituídas basicamente de re-arranjos (duplicações) e/ou regiões de DNA repetitivo e mutações (BENNETZEN e KELLOGG, 1993; ILIC et al., 2003; MA et al., 2005; MA e BENNETZEN, 2005).

Salse et al. (2004) evidenciaram que para 1.046 seqüências ESTs (*Expressed sequence tags*) de milho, foram encontradas 656 (62,7%) regiões homólogas no genoma do arroz. Recentes estudos realizados pela Iniciativa Internacional de *Brachypodium* (BII, 2010) evidenciaram que entre 25.532 genes codificadores de proteínas em *Brachypodium distachyon*, 7216 apresentavam ortólogos em sorgo e 8533 ortólogos em arroz. Todas essas relações são de extrema importância tendo em vista que podem fornecer importantes informações para estudos de genômica funcional e estrutural para as poáceas (BII, 2010).

2.4 Melhoramento genético

O melhoramento genético tem sido um dos grandes responsáveis pelos avanços na agricultura, com o desenvolvimento de cultivares superiores, mais produtivas e melhor adaptadas a condições adversas (pragas, moléstias, seca, frio, salinidade, toxidez por alumínio, ferro, ácidos orgânicos, entre outros), as quais restringem a expressão do potencial produtivo das cultivares. De modo geral, o principal objetivo dos programas de melhoramento genético de todas as espécies

cultivadas é o aumento da produtividade, e para a cultura do arroz não é diferente. Neste intuito os programas de melhoramento buscam constantemente por constituições genéticas superiores que apresentem maior potencial genético para produtividade.

Para a obtenção de genótipos superiores o melhoramento genético de plantas requer três etapas fundamentais: presença da variabilidade genética, eficiência na seleção dos genótipos mais promissores e ajuste das melhores constituições genéticas ao ambiente de cultivo. Entretanto, a identificação dessa variabilidade não é um processo fácil, visto que, ao avaliar a expressão de um determinado caráter, muitas vezes a manifestação deste vem mascarada pelo efeito do ambiente, ou ainda, por interações alélicas ou gênicas. Estes fatos tornam o trabalho de seleção do melhorista mais complicado, exigindo que algumas investigações sejam repetidas por vários anos e em locais distintos, no intuito de lograr a ação do ambiente (CARVALHO et al., 2003).

O sucesso de um programa de melhoramento genético depende fundamentalmente destas etapas citadas anteriormente, que podem ser auxiliadas e aceleradas por meio da utilização mais efetiva dos marcadores moleculares. Atualmente, técnicas da biotecnologia, como os marcadores moleculares, têm sido utilizadas como estratégias auxiliares na superação destas dificuldades, pois seu uso associado a genes de interesse, torna possível a identificação de genótipos portadores de alelos promissores sem a ação do ambiente (MAIA, 2007). Essas tecnologias aliadas permitem que, constantemente, sejam lançadas no mercado novas cultivares com maior potencial de rendimento de grãos em relação às pré-existentes, resistentes as principais moléstias que atingem a cultura e tolerantes a estresses abióticos como: seca, frio, salinidade, toxidez por alumínio, ferro e ácidos orgânicos, entre outros. No entanto, os avanços na obtenção de genótipos superiores são altamente dependentes da variabilidade genética disponível.

Os marcadores moleculares são ferramentas úteis na identificação de alelos de interesse. São definidos como marcas genéticas detectadas por polimorfismo de DNA em nível de um loco específico e em nível completo do DNA (VARSHNEY et al. 2005a). Atualmente diversos marcadores moleculares estão disponíveis e são capazes de acessar a variabilidade em nível molecular. Os marcadores moleculares disponíveis RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphisms*), RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), SSR (*Simple Sequence Repeats*), AFLP (*Amplified*

Fragment Length Polymorphisms), SNP (*single nucleotide polymorphisms*), entre outros, podem diferir no que diz respeito a características importantes como: abundância genômica, nível de polimorfismo detectado e informação genética, especificidade dos locos, reprodutibilidade, requerimentos técnicos, labor e investimento financeiro. Estes podem ser utilizados na genotipagem de organismos, detecção de variabilidade genética, identificação de híbridos, testes de paternidade, diagnósticos genéticos, mapeamento genético e seleção assistida por marcadores moleculares (VARSHNEY et al., 2005a).

Paralelamente à identificação de genes, a caracterização da função dos mesmos é fundamental para a compreensão de processos biológicos nos quais estes estão envolvidos, como: a diferenciação celular, morfogênese, determinação fenotípica, resistência a fatores bióticos e abióticos e adaptabilidade. Isto porque um único gene pode produzir diferentes tipos de RNAm e proteínas em resposta a estímulos que variam em função do macroambiente e das variações no ambiente celular. Por este motivo, além de estudos de genômica, outras análises como transcritômica, proteômica e metabolômica também ganham cada vez mais importância com o objetivo de traçar perfis funcionais da célula e/ou tecido, fornecendo uma visão holística da interação genes-fenótipo.

O estudo do conjunto de transcritos expressos em uma célula ou tecido (transcritômica) representa o primeiro passo na caracterização funcional dos genes. As metodologias utilizadas para estabelecer perfis transcricionais baseiam-se na geração de populações de cDNA a partir da população de RNAm expressa em uma célula ou tecido. Algumas técnicas permitem estudar o perfil de expressão de genes que já tenham sido previamente caracterizados e que estão disponíveis nos bancos de dados públicos, permitindo acessar os genes de interesse, através do uso de sondas ou *primers* específicos (LABATE et al., 2007). A técnica de *qRT-PCR* (*Quantitative Transcriptase Reverse da Reação de Polimerase em Cadeia em Tempo Real*) é uma delas, sendo bastante utilizada na identificação de genes com expressão diferencial, apresentando especificidade, sensibilidade e reprodutibilidade na quantificação do produto final amplificado (FREEMAN, 1999).

De acordo com Higuchi (1992), através da *qRT-PCR* é possível monitorar a fluorescência emitida durante a reação, a qual é o indicativo da produção de *amplicons* produzidos durante cada ciclo do PCR, diferentemente dos demais métodos que detectam o produto apenas no final da reação. A realização de estudos

que visam á caracterização dos genes envolvidos na expressão de tolerância ao ferro através de marcadores moleculares é de grande importância, pois torna mais viável e eficiente a prática de seleção de genótipos promissores para utilização em programas de melhoramento genético deste cereal.

2.5 Mecanismos moleculares envolvidos na resposta a estresses abióticos

Os estresses abióticos podem ser divididos em estresses nutricionais e ambientais, sendo que no primeiro caso pode-se englobar escassez de nutrientes, como nitrogênio e fósforo ou toxidez por excessos de elementos no solo, como o alumínio e ferro. No segundo caso pode-se agrupar os estresses causados por condições climáticas adversas, como seca, altas ou baixas temperaturas, encharcamento do solo e salinidade que são responsáveis por danos as culturas agrícolas. Para sobreviver a estes desafios as plantas desenvolveram mecanismos elaborados para perceber sinais externos e manifestar respostas adaptativas através de variações fisiológicas e morfológicas (BOHNERT et al., 1995).

A adaptação e aclimação aos estresses resultam de eventos integrados que ocorrem em todos os níveis de organização, desde o anatômico e morfológico até o celular, bioquímico e molecular (TAIZ; ZEIGER, 2004). Em nível molecular, a percepção dos estímulos extracelulares e conseqüentemente a ativação de respostas de defesa são a chave para uma complexa interação entre as cascatas de sinalização (vias) e o sistema de transdução. Várias são as vias de percepção e de sinalização do estresse, algumas são específicas, outras não, podendo gerar uma rede de interações no sistema de transdução de sinais, conhecida como conversa cruzada (*crosstalk*) (FUJITA et al., 2006). O entendimento dos eventos moleculares ligados a percepção de um sinal de estresse que levam a tolerância é de grande valia, e tem sido buscado exaustivamente pela pesquisa.

É de grande importância o estudo da rede gênica envolvida na regulação das diferentes classes de estresses abióticos. A análise da expressão de genes em linhagens/cultivares próximas geneticamente, mas contrastantes quanto à resistência a um determinado estresse abiótico, permite a compreensão das bases moleculares envolvidas na resposta a esses estresses, representando uma importante ferramenta para o avanço no entendimento do comportamento das plantas frente a condições adversas.

2.6 Solos hidromórficos do Sul do Brasil

Os solos de várzea, encontrados nas planícies de rios, lagoas e lagunas, caracterizam-se pela drenagem natural deficiente (hidromorfismo). No Rio Grande do Sul, representam uma área de aproximadamente 5.400.00 ha cerca de 20% da área total do Estado (PINTO, 2004). Em Santa Catarina, os solos de várzea acupam aproximadamente 7% da área total do Estado. Estes solos de relevo plano e que apresentam camadas impermeáveis no subsolo são destinados quase que exclusivamente para o cultivo do arroz (PINTO et al., 1999).

Ao longo do processo de formação dos solos, os minerais mais solúveis são lixiviados, enquanto o menos solúveis vão sendo acumulados. Óxidos de ferro e alumínio são minerais de difícil solubilidade e que, portanto, acabam se acumulando nos solos (VIEIRA, 1988). O material de origem dos solos tem grande importância na determinação da ocorrência de toxidez causada em função do acúmulo de um ou mais minerais presentes em excesso no solo, como o ferro e o alumínio, por exemplo, que são fatores limitantes para a produção de arroz.

Os solos de várzea da Metade Sul do Estado, são de origens diferentes, sendo os solos da Fronteira Oeste constituídos por sedimentos de basalto, Campanha e Depressão Central principalmente por arenitos, siltitos, argilitos e folhelhos (sendo os arenitos pobres em ferro e os folhelhos ricos em ferro) e o Litoral Sul por sedimentos de granito (pobre em ferro) (BRASIL, 1973).

2.7 Ferro no solo

O ferro é um dos elementos mais abundantes da crosta terrestre (MURAD e FISCHER, 1988), presente no solo em concentrações que podem variar entre 0,7% a 55% (LINDSAY, 1979) e distribuído de forma uniforme ou concentrado (KAMPF, 1988). O ferro está presente na solução do solo como Fe^{2+} (ferroso), Fe^{3+} (férico) e complexos orgânicos, podendo ser absorvidos pelas plantas nessas três formas. Como o Fe^{3+} é pouco solúvel, o Fe^{2+} e o ferro em complexos orgânicos solúveis são as principais formas de absorção e transporte na planta (MARSCHNER, 1995).

O Fe^{3+} é um composto de baixa solubilidade e encontra-se normalmente precipitado, quelado a matéria orgânica. Desta forma, o principal problema da

disponibilidade do ferro não é a abundância, mas a solubilidade dos óxidos de ferro, que é extremamente baixa em ambientes aeróbicos e de pH alcalino (CHRISTOU, 1994; MARSCHNER, 1995). Já em solos alagados, a água funciona como uma barreira para a difusão do oxigênio atmosférico para o solo, tornando o ambiente hipóxico. O oxigênio molecular dissolvido na água é consumido pelos microrganismos aeróbicos, que com o tempo são substituídos pelos anaeróbios, resultando num ambiente de redução e acúmulo de CO_2 .

O acúmulo de CO_2 tende a decrescer o pH devido à sua dissolução na solução do solo com a formação de H_2CO_3 (VALH; SOUSA, 2004), favorecendo a redução de compostos oxidados (PONNAMPERUMA, 1972). Ocorre, portanto, à solubilização ou redução do Fe^{+3} à Fe^{+2} , liberando o mesmo para a solução do solo aumentando a disponibilidade de ferro em níveis que podem ser tóxicos às plantas cultivadas neste ambiente (BECANA et al., 1998).

Durante o alagamento ocorre um rápido decréscimo do pH do solo nos primeiros dias, com posterior aumento assintótico atingindo valores estáveis após, aproximadamente, 30 dias (MORAES; FREIRE, 1974). Posteriormente, conforme o solo é reduzido, o pH se eleva e, quando atinge valores ao redor de 6,0 - 6,5, o efeito do CO_2 começa a se acentuar em sentido contrário, e os dois efeitos se anulam, entrando o pH em equilíbrio (VALH; SOUSA, 2004).

2.8 Importância do ferro na nutrição das plantas

O ferro é um nutriente essencial para o desenvolvimento das plantas (CURIE; BRIAT, 2003), pois atua como cofator de diversas enzimas que participam de importantes processos metabólicos como: fotossíntese, respiração, fixação do nitrogênio, síntese de clorofila e citocromos, entre outros (TAIZ; ZEIGER, 2004). Em plantas, o ferro é utilizado principalmente nos cloroplastos, mitocôndrias e peroxissomos para a efetivação das reações de oxidação/redução (redox) (GEORGE et al., 2008).

O ferro na planta apresenta a capacidade de formar complexos com vários ligantes orgânicos e alterar seu estado de oxirredução, participando de importantes sistemas biológicos (MENGEL; KIRKBY, 1987; MARSCHNER, 1995; TAIZ; ZEIGER, 1998). No entanto, as mesmas propriedades físicas que permitem ao ferro atuar

como um eficiente cofator e catalisador nas reações redox na célula, também potencializam sua atuação como elemento tóxico.

O metabolismo do ferro é um mecanismo complexo sob um balanço homeostático, representando dois problemas principais para as plantas: deficiência como consequência de problemas de solubilidade em condições aeróbicas e toxicidade devido ao excesso de solubilidade em condições anaeróbicas (SANTOS; COSTA de OLIVEIRA, 2007). A deficiência de ferro é extremamente prejudicial ao desenvolvimento das plantas, podendo ocasionar a supressão do crescimento do meristema apical e cloroses nas folhas (LARCHER, 2003), estando também associada à senescência tanto de folhas (SPEROTTO et al., 2007) quanto de raízes (SPEROTTO et al., 2008).

2.9 Absorção de ferro pelas plantas

As plantas apresentam mecanismos específicos para a absorção de ferro a fim de suprir a demanda para o crescimento e desenvolvimento e também para evitar a toxicidade pelo excesso de ferro, pois ambas as situações podem ser prejudiciais ao seu perfeito funcionamento fisiológico (PONNAMPERUMA et al., 1972). Em condições normais, com uma concentração de ferro no solo suficiente para suprir as exigências nutricionais da planta, essas reduzem Fe^{+3} a Fe^{+2} e o transportam, através da membrana plasmática via um transportador específico (CURIE; BRIAT, 2003). Em condições aeróbicas a concentração de Fe^{+2} na solução do solo normalmente é baixa (MENGEL; KIRKBY, 1987). Para essas condições, as plantas desenvolveram diferentes estratégias a fim de diminuir os riscos de deficiência de ferro, aumentando a captação deste nutriente. De acordo com Römheld (1987) e Marschner e Römheld (1994) estas estratégias foram denominadas de Estratégia I (redução do Fe^{3+} a Fe^{2+}) e Estratégia II (quelação do Fe^{3+}).

Estratégia I, adotada pelas plantas superiores (dicotiledôneas e monocotiledôneas), com exceção das gramíneas, consiste na: **i)** protonação da rizosfera através de uma H^+ -ATPase específica da membrana plasmática que acidifica o pH da solução do solo e aumenta a solubilidade do Fe^{3+} ; **ii)** redução do Fe^{3+} para Fe^{2+} através da enzima quelato redutase (FRO, *Ferric Reductase Oxidase*); e **iii)** transporte do Fe^{2+} para a raiz através de um transportador de especificidade seletiva (IRT1, *Iron*

Regulated Transporter1) (RÖMHELD e MARSCHNER, 1986; MARSCHNER e RÖMHELD, 1994; EIDE et al., 1996; CONNOLLY e GUERINOT, 2002).

Estratégia II, desenvolvida pelas poáceas monocotiledôneas como arroz, milho e trigo, consiste na: **(i)** liberação de fitosiderofóros (PS) através das raízes, que são aminoácidos não protéicos sintetizados a partir de compostos de uma família de ácidos mugineicos (MAs) que inclui os ácidos mugineico (MA), 2'-deoximugineico (DMA), 3-epihidroximugineico (epi-HMA) e 3-epihidroxi 2'-deoximugineico (epi-HDMA) liberados na rizosfera de plantas sob deficiência de ferro, com o objetivo de aumentar a absorção de ferro (CURIE e BRIAT, 2003). Estes compostos apresentam alta afinidade e propriedades minerais quelantes, assim, se ligam ao Fe^{3+} na rizosfera, formando o complexo estável Fe^{3+} -PS (solúvel), desta forma podendo ser absorvido por transportadores sem que seja necessária uma redução extracelular (TAKAGI et al., 1984; ROBERTS et al., 2004). A família gênica *NAS* (*Nicotianamina sintase*) está envolvida na síntese de nicotianamina (NA), precursora e essencial na síntese dos ácidos mugineicos. **(ii)** os complexos formados são reconhecidos e transportados para o interior das células da raiz por transportadores específicos da família *Yellow Stripe –Like* (YSL), (MORI, 1999), e usados como fonte de ferro na planta (MORI, 1999; CURIE et al., 2001; HELL e STEPHAN, 2003; SCHAAF et al., 2004). Além das estratégias citadas acima, alterações morfológicas na raiz e aumento da concentração de citrato no floema, também tem como função auxiliar na absorção de ferro (SCHMIDT, 1999).

Apesar de fazer parte da classe das poáceas que tem como característica a absorção de complexos Fe^{3+} /fitosideróforos pela estratégia II, já foi evidenciado que o arroz também é capaz de absorver Fe^{2+} diretamente da rizosfera (ISHIMARU et al., 2006). Gross et al. (2003) identificaram a presença de genes de estratégia I no genoma de arroz, o *OsFRO1* e *OsFRO2*, genes prováveis da redutase férrica. Bughio et al. (2002) já haviam identificado homólogos do gene *IRT1* em arroz após isolarem o *OsIRT1*, que codifica para uma proteína transportadora de Fe^{2+} , confirmando sua expressão em raízes, o que determina que o arroz também é capaz de absorver Fe^{2+} da rizosfera. Portanto, além da absorção de Fe^{+3} ligado a fitossideróforo, plantas de arroz também absorvem Fe^{+2} por meio do transportador *OsIRT1*.

Diante disso, foi constatado que o arroz possui as duas estratégias de absorção de ferro. É possível pois, que esta capacidade esteja relacionada a uma

característica adaptativa do arroz, tendo em vista que em solos alagados a disponibilidade de ferro Fe^{+2} é muito maior que a de Fe^{3+} (ISHIMARU et al., 2006). Como relatado anteriormente, as plantas apresentam estratégias que reduzem os riscos de deficiência de ferro. No entanto, em algumas condições em que a concentração de ferro no solo é muito elevada, as plantas podem absorvê-lo excessivamente o que pode resultar em graves problemas de toxidez. Assim, as plantas precisam manter a homeostase do ferro, absorvendo quantidades necessárias do micronutriente e ao mesmo tempo se protegendo contra o excesso do íon em seus tecidos (BRIAT; LOBRÉAUX, 1997).

2.10 Toxidez por excesso de ferro

A toxidez por ferro é um distúrbio nutricional que afeta amplamente as lavouras de arroz irrigado em diversos locais do mundo, principalmente em países da Ásia, incluindo China, Índia, Indonésia, Tailândia, Malásia e Filipinas; Oeste da África e América do Sul (WARDA, 2001; SOUSA et al., 2004). Este distúrbio é um dos mais importantes estresses abióticos a limitar produção do arroz irrigado (DOBERMANN; FAIRHURST, 2000). Segundo Audebert e Fofana (2009), o tempo de duração e a intensidade do estresse por Fe^{2+} estão diretamente correlacionados às condições ambientais e a disponibilidade de Fe^{2+} presente na solução do solo. Deste modo, a eficácia de um determinado mecanismo de tolerância é dependente da intensidade e da duração do estresse por Fe^{2+} (ASCH et al., 2005).

O cultivo irrigado é a principal e mais produtiva forma de cultivo de arroz no Rio Grande do Sul. Em decorrência da inundação do solo como requer o cultivo irrigado, ocorre uma redução do oxigênio e microrganismos anaeróbicos passam a utilizar-se de compostos oxidados do solo; essas reações de redução modificam o pH e aumentam a disponibilidade de vários elementos, entre eles o íon ferroso (Fe^{2+}), antes precipitado na forma de íon férrico (Fe^{3+}) quelado à matéria orgânica presente no solo (PONNAMPERUMA, 1972). O aumento da concentração de Fe^{2+} na solução do solo pode levar a uma absorção excessiva deste metal, o qual é mais solúvel e, portanto, mais facilmente absorvido pelas plantas, sendo rapidamente acumulado nas folhas, podendo causar perdas consideráveis na produção de arroz (SAHRAWAT, 2004). De acordo com Bacha (1993), nas condições brasileiras as reduções na produtividade podem chegar a 80%. No Rio Grande do Sul, segundo o

Instituto Rio-Grandense do Arroz, esta proporção pode alcançar a 20% (IRGA, 2004). O excesso de ferro leva à potencialização de estresse oxidativo, com aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), superóxido (O_2^-) e radical hidroxila ($OH^\cdot$), este último considerado o mais tóxico para a célula (SINHA et al., 1997; BECANA et al., 1998; FANG et al., 2001; SOUZA-SANTOS et al., 2001; EATON e QIAN, 2002), desencadeando inúmeros sintomas fisiológicos, bioquímicos e morfológicos. As desordens nutricionais associadas à toxidez por ferro são classificadas em toxidez direta e indireta (VAHL, 1991) ou toxidez verdadeira e pseudo-toxidez (SAHRAWAT, 2004).

Toxidez direta ou toxidez verdadeira - ocorre em virtude da absorção excessiva de ferro e posterior acúmulo nos tecidos. É caracterizada pela presença de pontuações castanho-escuras sobre a superfície das folhas (bronzamento) ocasionadas pela morte das células nos locais onde o ferro está depositado, além de retardo no crescimento e conseqüente redução de produtividade, podendo em casos extremos acarretar na morte da planta (PONNAMPERUMA et al. 1972; VAHL, 1991), não sendo observada qualquer deficiência aparente de outros nutrientes (SAHRAWAT, 2004).

Toxidez indireta ou pseudo-toxidez - ocorre em virtude da formação de capa ferrúcia (acúmulo de óxido de ferro sobre a superfície das raízes), acarretando na redução de absorção, transporte e/ou utilização de outros nutrientes pelas plantas como P, K, Ca, Mg e Zn. As folhas desenvolvem uma coloração amarelada (amarelecimento) que evolui do ápice para a base (VAHL, 1991; MEURER, 2000; SAHRAWAT, 2004). A pseudo-toxidez pode ocorrer em níveis mais baixos de ferro na solução do solo do que a toxidez verdadeira (SAHRAWAT, 2004).

Na cultura do arroz os principais sintomas de toxidez são inicialmente evidenciados nas raízes das plantas que tendem a paralisar seu crescimento e aumentar a espessura (engrossamento). Eles podem surgir em qualquer estágio de desenvolvimento, sendo mais comumente observados no período de afilhamento e no início da floração (VAN MENS VORT et al., 1985; FAGERIA, 1984; SOUSA et al. 2006). Nos estágios iniciais de desenvolvimento as plantas sofrem severo retardo no crescimento e afilham pouco. Já em estágios mais avançados o crescimento vegetativo não é muito afetado, mas o rendimento de grãos é reduzido devido à produção de panículas menores e alta proporção de espiguetas estéreis (YOSHIDA 1981, LANTIN; NEUE, 1988).

Elevados teores de Fe^{2+} (100-1000 mg L^{-1}) foram encontrados em solos com problema de acidez (PONNAMPERUMA, 1972). Em solos extremamente ácidos como os encontrados no Vietnã, no Oeste da África e na Tailândia, normalmente explorados por mineralogia, as concentrações de ferro ficam entre 500 a 5000 mg L^{-1} e nos tecidos das plantas estas normalmente variam entre 500 e 2000 mg kg^{-1} (HAMSEN; VAN BREEMEN, 1975). Em outras regiões como Filipinas e Madagascar, as concentrações normais variam entre 300-1000 mg L^{-1} e nos tecidos ficam entre 300-800 mg kg^{-1} . Já nas regiões de vales de Madagascar e Siri Lanka e zonas úmidas do Oeste da África as concentrações críticas variam entre 20-600 mg L^{-1} . Nos tecidos as concentrações verificadas são bastante variadas, de modo geral 300 mg kg^{-1} é considerada crítica (BECKER; ASCH, 2005).

No Rio Grande do Sul os teores críticos na solução do solo normalmente variam de 30 mg L^{-1} a concentrações acima de 500 mg L^{-1} (SOUSA et al., 2006). Uma concentração de 300 mg L^{-1} na solução do solo normalmente é considerada crítica, limitando o cultivo de arroz irrigado (LANTIN; NEUE, 1989). Porém dependendo do local e da cultivar utilizada, os níveis críticos podem variar entre 20 e 2500 mg L^{-1} , indício de que a toxidez por ferro está relacionada a outros fatores além da concentração de ferro no solo, como por exemplo o pH do solo (TADANO; YOSHIDA, 1978). Tadano (1976) observou sintomas de toxidez por ferro em solos neutros, enquanto que em solos com acidez elevada esses sintomas não foram expressos na cultura do arroz. Sousa et al. (2006), relatam que a presença de elevados teores de ferro no solo não é a única característica determinante para a ocorrência de toxidez, outros fatores como, pH, teor de matéria orgânica, temperatura, características eletroquímicas de superfície, tempo de alagamento, natureza e grau de cristalinidade dos óxidos de Fe, também exercem forte influência sobre a ocorrência e a intensidade do estresse.

2.11 Controle da toxidez

Segundo Becker e Asch (2005), existem três tipos principais de estratégias de controle desencadeadas pela própria planta em resposta ao estresse por ferro que são: (i) exclusão - que ocorre através da oxidação do Fe^{2+} em Fe^{3+} , na qual as raízes liberam oxigênio a fim de reoxidar o Fe^{2+} , reduzindo a disponibilidade de ferro para as plantas; (ii) inclusão/anulação - o Fe^{2+} é absorvido pelas raízes, no entanto, os

danos que poderiam ser causados aos tecidos são evitados através da imobilização ou remobilização do ferro ativo em locais denominados de "aterros", por exemplo, folhas velhas ou folhas fotossinteticamente menos ativas; (iii) inclusão/tolerância - as plantas toleram elevados teores de Fe^{2+} provavelmente via "desintoxicação" enzimática no simplasto.

Quando as plantas não são capazes de impedir a entrada de ferro em excesso nos seus tecidos, uma das formas que a célula vegetal utiliza a fim de limitar os danos causados pelo excesso do íon metálico é armazená-lo em complexos de ferro-proteína, chamados fitoferritinas (TAIZ; ZEIGER, 2004). As ferritinas são proteínas presentes em todos os organismos vivos, e tem a função de armazenar o ferro que é absorvido pelas células, mas que não é utilizado nos processos metabólicos (LOBRÉAUX et al., 1992; BRIAT; LOBRÉAUX, 1997), desempenhando importante função de proteção das células contra o excesso de ferro. Algumas técnicas de manejo como: calagem, atraso do início do alagamento, drenagem, e aumento e/ou antecipação da adubação fosfatada e potássica, também podem ser adotadas a fim de minimizar os problemas de toxidez (SOSBAI, 2007). Sahrawat et al. 2004, evidenciaram que o suprimento de potássio (K) aumenta o potencial redox das raízes (Fe^{2+} em Fe^{3+}) além de estar envolvido tanto na exclusão de ferro quanto na translocação para as folhas (HOWELER, 1973; TADANO, 1975).

A característica de tolerância a toxidez por ferro tem sido sistematicamente avaliada nas constituições genéticas em processo de melhoramento (VAHL, 1991). Segundo Magalhães Jr. (2005), uma alternativa eficiente para evitar os efeitos da toxicidade por ferro em lavouras de arroz irrigado, cujos solos apresentam histórico de ocorrência do problema, é utilização de cultivares tolerantes. Tendo em vista que a exploração do potencial genético é uma das estratégias mais promissoras a fim de controlar o problema. Estudos já demonstraram que variedades de arroz diferem amplamente quanto aos níveis de tolerância à toxidez por ferro e também quanto a outros estresses abióticos, variando em relação à fase fenológica da planta como também em relação aos mecanismos envolvidos (SAHRAWAT, 2004), seja através de métodos de melhoramento convencional (AKBAR et al., 1987; GUNAWARDENA et al., 1982; MAHADEVAPPA et al., 1991; SAHRAWAT et al., 1996; LUO et al., 1997; MAGALHÃES JR. et al., 2005, 2007; CRESTANI et al., 2009) ou através do uso de ferramentas biotecnológicas como análise de QTLs (*Quantitative Trait Loci*),

combinado ao uso de marcadores moleculares (WU et al., 1998; BENNETT, 2001; SHIMIZU et al., 2005; WISSUWA, 2005).

Mesmo diante de todas estas medidas de controle citadas acima, não se pode destacar uma medida que seja totalmente eficaz no controle do estresse por ferro, pois deve-se sempre considerar a grande diversidade de ambientes onde o problema pode se manifestar (BECKER; ASCH, 2005), tornando o conhecimento sobre a fisiologia do estresse o mais relevante na busca por uma solução verdadeiramente eficiente. Na busca deste conhecimento é essencial o entendimento de todos os mecanismos envolvidos na homeostase do ferro, o que envolve os processos fisiológicos básicos de absorção do metal, seu transporte e armazenamento (GRUSAK, 2002; GROSS et al., 2003; COLANGELO; GUERINOT, 2006), bem como a identificação de genes ativados ou reprimidos em resposta ao excesso e à deficiência desse metal. Existem várias famílias gênicas envolvidas na homeostase de ferro em plantas (GROSS et al., 2003). Estes genes têm sido estudados em várias espécies de plantas e importantes avanços foram feitos, buscando a elucidação destes mecanismos.

2.12 Transporte de ferro na planta

Após ser absorvido pelas raízes, o ferro é transportado para a parte aérea via xilema, através do fluxo transpiratório. Segundo Gross et al. (2003), já foram identificados 43 genes potencialmente envolvidos na homeostase do ferro, incluindo três famílias de transportadores. As principais famílias gênicas envolvidas na homeostase de ferro em plantas são *Yellow Stripe Like* (YSL), *Natural Resistance Associated Macrophage Proteins* (NRAMP), *Nicotianamine Sintase* (NAS), *Iron Regulated Transporter* (IRT) e *Ferric Reductase Oxidase* (FRO) (CURIE et al., 2003). No xilema, o Fe^{3+} é quelado ao citrato que é o principal quelante de metais neste tecido (CATALDO et al., 1988; CURIE e BRIAT, 2003), constituindo o complexo Fe^{3+} -citrato. Segundo He et al. (2004), proteínas pertencentes à família MATE (*Multidrug and Toxic Compound Extrusion*) estão envolvidas no transporte de citrato em plantas. Em *Arabidopsis* foi evidenciado que o gene *AtFRD3* (*Ferric Reductase Defective3*) pertencente à esta família, atua no transporte de citrato, componente necessário para que ocorra a translocação de ferro das raízes para a parte aérea (DURRET et al., 2007). No genoma do arroz foi recentemente

identificado um homólogo do *AtFRD3*, um transportador de citrato denominado de *OsFRDL1* (YOKOSHO et al., 2009).

Nas folhas o complexo Fe^{3+} -citrato será reduzido a Fe^{2+} através de redutases de membrana plasmática (MARSCHNER, 1995). O gene *FRO* codifica para enzima Fe^{3+} quelato redutase presente nas células epidérmicas radiculares, que é responsável por essa redução (YI; GUERINOT, 1996). Waters et al. 2002, evidenciaram a presença de redutases do tipo *FRO*, no mesófilo de folhas de ervilha (*FRO1*) e em folhas de *Arabidopsis* (*FRO2*) em resposta a deficiência de ferro. Em *Arabidopsis* já foram relatados oito membros da família de genes *FRO*. O gene *AtFRO2* é expresso predominantemente nas células epidérmicas de raízes sob deficiência de ferro (ROBINSON et al., 1999; WINTZ et al., 2003). De acordo com Wintz et al. (2003), a superexpressão do *AtFRO2* permite a planta desenvolver-se sob condições de carência do metal. Feng et al. (2006), evidenciaram a expressão de proteínas *FRO* em diversos tecidos de plantas de *Arabidopsis*, sugerindo uma ampla participação desta família de genes na redução do Fe^{3+} . O *AtFRO3* tem sua expressão induzida em folhas de plantas sob deficiência de ferro (WINTZ et al. 2003), assim como *AtFRO5*, *AtFRO6*, *AtFRO7* e *AtFRO8* (FENG et al., 2006). No genoma do arroz foram identificados dois genes prováveis da redutase férrica o *OsFRO1* e o *OsFRO2* (GROSS et al., 2003), sendo o *OsFRO1* expresso em folhas de arroz sob deficiência de Zn, Cu e Mn, enquanto que o *OsFRO2* também expresso em folhas sob deficiência de Fe não é expresso em raízes (ISHIMARU et al., 2006).

Após a redução, o Fe^{2+} formado é transportado para os demais órgãos da planta via apoplasto (MARSCHNER, 1995), indicando a existência de um transportador específico de Fe^{2+} nas células foliares (BRUGGEMANN et al., 1993). De acordo com Takahashi et al. (2003), esse transportador específico de Fe^{2+} no floema, interior da célula e tecidos reprodutivos é o ácido nicotinamínico ou nicotianamina (NA) biossintetizada a partir da combinação de três moléculas de S-adenosilmetionina (SAM), sendo, a família gênica das *NAS* (*Nicotianamina sintase*) responsável por catalisar esta reação. A NA possui grande afinidade pelo íon ferroso. Portanto, além de precursora essencial da síntese de ácidos mugineicos (PS) a NA pode se ligar a vários metais, dentre eles Fe^{2+} e Fe^{3+} , não sendo secretada após este processo, o que sugere sua participação no transporte intra e intercelular de metais em espécies tanto da estratégia I como da II (KIM et al., 2007).

Pich et al. (2001), verificaram que em mutantes de ervilha que superacumulam ferro, a concentração de NA aumenta principalmente no interior dos vacúolos, enquanto que em condições normais e de deficiência de ferro, a NA somente é encontrada no citoplasma da célula, fato que segundo Curie et al. (2001), destaca o importante papel de mecanismos de transporte de Fe/NA na resistência a níveis tóxicos de ferro em plantas. Mori et al. (1991), evidenciaram que a expressão das NAs em raízes é regulada pela disponibilidade do ferro, e que a quantidade de NA liberada no solo esta diretamente relacionada à habilidade da planta em tolerar a deficiência de ferro. Plantas de arroz, especialmente nos estágios iniciais de desenvolvimento, são altamente sensíveis a deficiência de ferro. O arroz produz menos ácido mugineico (MA) que a cevada ou a aveia, que podem produzir também outras formas de PS, e durante mais tempo, podendo ser esta a razão que torna estas duas culturas relativamente mais resistentes à deficiência de Fe que o arroz. Takahashi et al. (2001) demonstraram um aumento na captação de Fe em plantas de arroz transformadas com dois genes *NAAT* (nicotianamina amino transferase) de cevada, uma enzima chave no processo de biossíntese de MA.

Os primeiros genes *Nas* identificados foram em cevada, na qual o gene *NAS1* é expresso apenas em condições extremas de deficiência de Fe (HIGUCHI et al., 1999), constatado em tomate (LING et al., 1999); *Arabidopsis* (SUZUKI et al., 1999), arroz (HIGUCHI et al. 2001) e milho, onde os transcritos de *NAS1* e *NAS2* tem sua expressão induzida em raízes sob deficiência do metal (MIZUNO et al., 2003). Em arroz foi verificado um aumento na expressão do gene *OsNAS1* tanto em raízes quanto em folhas, em resposta a deficiência de Fe (HIGUCHI et al., 1999). Narayanan et al. (2007) também detectaram a expressão de *OsNAS1* em folhas.

Inoue et al. (2003), constataram que os genes *OsNAS1* e *OsNAS2* em condições de suficiência de Fe, são expressos nas células companheiras das raízes e nas células do periciclo adjacentes ao xilema, enquanto que na deficiência do mineral, além do *OsNAS1* e *OsNAS2* também o *OsNAS3* foi identificado em células atuantes no transporte de Fe à longa distância, evidenciando que as NAS estão envolvidas neste processo, além de sua participação na secreção de fitosideróforos pela raiz.

Além de complexado ao NA, o ferro também pode ser transportado por polipeptídeos e proteínas através do floema. Em *Ricinus communis* foi identificada uma proteína denominada de ITP (*Iron transport protein*), capaz de ligar-se

especificamente ao ferro na forma oxidada (Fe^{3+}) e a outros metais na forma reduzida, como, Cu^{2+} , Zn^{2+} e Mn^{2+} (KRÜEGER et al. 2002).

Já identificados e caracterizados em *Arabidopsis* (EIDE et al., 1996; VERT et al., 2001) e tomate (ECKARDT et al., 2001) os transportadores IRT, pertencentes a família ZIP que codificam para proteínas que atuam no transporte de Zn (ZRT: *Zinc Regulated Transporter*) e Fe^{2+} (IRT - *Iron Regulated Transporter*), é composta até o momento por 11 genes. O *IRT1* é um transportador específico do Fe^{2+} (EIDE et al., 1996) do solo para a raiz (estratégia I de absorção), sendo considerado o mais importante de raízes (CONNOLLY et al., 2002), o *AtIRT1* de *Arabidopsis* foi o primeiro membro da família identificado em plantas superiores, é expresso especificamente em raízes induzido pela deficiência de Fe, desempenhando um papel fundamental na absorção de ferro do solo (VAROTTO et al., 2002; VERT et al., 2002). Apresenta homólogos no genoma do arroz: *OsIRT1* e *OsIRT2* (BUGHIO et al. 2002; GROSS et al., 2003; ISHIMARU et al., 2006) que também são preferencialmente expressos em raiz e induzidos em resposta à deficiência de Fe (ISHIMARU et al., 2006; KIM et al., 2007). No entanto também já foram encontrados em folhas e colmos de arroz, o que indica sua participação no transporte de ferro a longas distâncias (ISHIMARU et al., 2006; NARAYAINAN et al., 2007). O *AtIRT2* de *Arabidopsis* é responsável pelo transporte de Fe^{+2} e Zn^{+2} (VERT et al., 2001; CURIE e BRIAT, 2003), expresso em células epidérmicas de raízes deficientes em ferro (VERT et al., 2001).

Segundo Curie et al. (2001), em condições de carência de Fe as gramíneas fazem uso da estratégia II de absorção, na qual ocorre a liberação de fitosideróforos (PS) através das raízes para o solo, onde estes, serão complexados ao Fe^{+3} formando o complexo Fe^{+3} -PS que será absorvido pelas células epidérmicas radiculares, nesta mesma forma sem sofrer redução, por meio de um transportador da família YSL, mais precisamente do *YSL1*. No genoma do arroz, Gross et al. (2003) identificaram 18 prováveis genes da família YSL por meio de estudos de homologia.

Foram encontrados membros desta família gênica, tanto em raízes quanto em folhas de plantas de arroz, sob excesso e deficiência de ferro. Um exemplo é o gene *OsYSL2* que codifica uma proteína transportadora de complexos metal-nicotianamina (NA) envolvida no transporte de Fe e Mn a longa distâncias dentro na planta. Este gene é expresso na membrana, no floema e em órgãos reprodutivos,

não sendo expresso em raízes (KOIKE et al., 2004) (GenBank AY512583). O *OsYSL13* assim como *OsYSL2* é preferencialmente expresso na parte aérea. Já *OsYSL6*, *OsYSL14* e *OsYSL16* são expressos tanto em raízes como na parte aérea. *OsYSL15* é expresso em raízes e os genes *OsYSL5*, *OsYSL6*, *OsYSL7*, *OsYSL8* e *OsYSL18* têm elevada expressão em folhas, incluindo a folha-bandeira, estando todos eles possivelmente envolvidos no transporte de metais (NARAYANAN et al., 2007).

Em milho foi identificado o *ZmYS1* expresso em raízes, mas não em folhas de plântulas sob condição de suficiência de ferro. Em condições de deficiência de Fe foi detectado um aumento na expressão do gene em raízes o que sugere sua atuação na absorção do mineral do solo. Já quando as plantas crescem na ausência de ferro sua expressão é induzida tanto em raízes como em folhas. Somente em tecidos com baixas concentrações de ferro foram verificados altos níveis da proteína *ZmYS1* (ROBERTS et al., 2004). Recentemente, um ortólogo em cevada (*HvYS1*) foi caracterizado, o qual tem expressão restrita às raízes e parece ser específico a absorção do complexo Fe^{3+} -PS (MURATA et al., 2006). De acordo com Curie et al. (2001), a expressão do *ZmYS1* também em folhas e colmos, além de raízes, sugere funções diferenciadas na planta, ou seja, além de participar do processo de captação de ferro do solo, pode estar envolvido também na distribuição de Fe para as partes aéreas através do transporte intercelular pelo colmo. Em mutantes de milho (*ys1*) é constatado problema na absorção de Fe^{3+} -PS, resultando na deficiência de Fe o que provoca a clorose internervuras denominada de “*yellow stripe*” (ROBERTS et al., 2004).

Em *Arabidopsis* também foram caracterizados diversos YS relacionados ao transporte de metais, inclusive do ferro, em folhas e em tecidos reprodutivos. No entanto, a presença de genes desta família em uma espécie que utiliza a estratégia I de absorção de ferro e que não sintetiza PS estaria relacionada ao transporte de metais complexados a NA, como já constatado com o *AtYSL1* (JEAN et al., 2005; WATERS et al., 2006), *AtYSL2* (DIDONATO et al., 2004) e *AtYSL3* (WATERS et al., 2006), fato, que também foi evidenciado em *Thlaspi caerulenscens* espécie acumuladora de metais em relação ao gene *TcYSL3* (GENDRE et al., 2007).

O gene *AtYSL1* regula os níveis de ferro e nicotianamina nas sementes (JEAN et al., 2005). Waters et al. (2006) evidenciaram um pouco mais tarde que o duplo mutante de *Arabidopsis ysl1ysl3* apresentava sintomas de deficiência de ferro,

como clorose internerval, além de ter a concentração de ferro nas sementes inferior a planta selvagem. Já o AtYSL2, transporta apenas Fe^{+2} e Cu^{+2} complexado com NA ou MA. Esse é expresso tanto na parte aérea quanto raízes, sugerindo que muitos tipos de células absorvem metais na forma complexada com NA ou MA e, de acordo com seu padrão de expressão, parece estar envolvido no transporte de metais no tecido vascular (DIDONATO et al. 2004). Curie et al. (2001) acreditam que a família YS possa estar relacionada a outras funções dentro da planta que não somente a de absorver Fe, tendo em vista que diversos homólogos YS foram relatados em dicotiledôneas.

Outra família gênica envolvida no transporte de ferro é a NRAMP (*Natural Resistance-Associated Macrophage Protein*), que codificam para proteínas integrais de membrana envolvidas no transporte de ferro em vários organismos (procariotos e eucariotos), sendo os genes que constituem esta família altamente conservados (CELLIER et al., 2001) e amplamente distribuídos na planta e em todas as famílias de plantas, estando envolvidos principalmente no transporte de cátions divalentes como Mn^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Cd^{2+} , Ni^{2+} e Co^{2+} (NEVO; NELSON, 2004). Os genes NRAMP estão presentes em todos os organismos, no caso das plantas, tanto em espécies gramíneas quanto em não-gramíneas. A ocorrência destes genes nos dois grupos de plantas independente da estratégia de absorção de ferro sugere uma ampla participação destas proteínas na homeostase de metais. As proteínas NRAMP não parecem estar envolvidas na absorção de ferro do solo, mas provavelmente são ativas em nível sub-celular (THOMINE, 2000). Nas plantas os NRAMP são representados por um elevado número de homólogos por espécie. Em *Arabidopsis thaliana* são sete membros e em arroz foram encontrados oito membros de NRAMP através de estudo de homologia com os genes NRAMP de *A. thaliana* (GROSS et al. 2003). Thomine e Schroeder (2004) encontraram ESTs homólogas de NRAMP em soja, algodão, tomate, milho e cevada.

De acordo com Curie et al. (2000), vários experimentos já evidenciaram o envolvimento dos genes AtNRAMP1, 3 e 4 e OsNRAMP1 na homeostase do ferro. O mesmo autor sugere que o gene AtNRAMP1 esteja relacionado ao transporte sub-celular de ferro e a sua segmentação em compartimentos de armazenamento como os vacúolos ou plastídios. AtNRAMP3 é expresso no tecido vascular de raízes, caules e folhas em condições de deficiência de ferro, estando possivelmente envolvido com a remobilização do ferro localizado no vacúolo para o metabolismo

celular e com o transporte a longa distância dentro da planta em condições de deficiência do metal (THOMINE, 2000, 2003).

Lanquar et al. (2005) evidenciaram que os genes *AtNRAMP3* e *AtNRAMP4* realizam a mobilização do Fe armazenado no vacúolo, o qual é essencial no processo germinação das sementes sob condições de deficiência de Fe. No genoma do arroz, como relatado anteriormente, oito genes foram relacionados à família NRAMP: cinco destes são genes prováveis, pois ainda não foram caracterizados quanto a sua possível localização e função nas células (GROSS et al., 2003), já os demais (*OsNRAMP1*, *OsNRAMP2* e *OsNRAMP3*) foram clonados e caracterizados na espécie, sendo expressos em diferentes órgãos da planta. *OsNRAMP1* é preferencialmente expresso em raízes, *OsNRAMP2* em folhas e *OsNRAMP3* é expresso em níveis semelhantes tanto em folhas quanto em raízes. (BELOUCHI et al.; 1997, CURIE et al., 2000). Thomine et al. 2000, evidenciaram o aumento de expressão do *OsNRAMP1* em condições de deficiência de ferro, relacionando o gene a absorção de Fe do solo e sugerem que esteja envolvido na remobilização do Fe para o citosol sob condições de deficiência do mesmo. Recentemente, Narayanan et al.(2007) relataram que os genes *OsNRAMP2*, *OsNRAMP4* e *OsNRAMP7* são superexpressos em folhas de modo geral, durante o estágio de enchimento do grão de arroz.

2.13 Armazenamento de ferro na planta

Uma vez no mesófilo, o ferro pode ser armazenado nos vacúolos ou estocado em ferritinas (BRIAT et al., 1997). Curie e Briat (2003) verificaram que em condições de excesso de ferro, os vacúolos são os principais responsáveis pelo aprisionamento de Fe. Segundo Kim e Guerinot (2007), os vacúolos atuam no acúmulo do excesso do metal e na sua liberação quando o suprimento externo é deficiente, sendo responsáveis pela re-translocação do complexo Fe-NA para o citosol. Na membrana vacuolar de sementes de *Arabidopsis* foi identificada recentemente uma proteína transportadora de Fe^{2+} , a VIT1 (*Vacuolar Iron Transporter 1*), responsável pelo armazenamento de Fe no vacúolo. Sua expressão sofre incremento durante o desenvolvimento do embrião e da semente, possivelmente estando envolvida na localização do Fe em sementes (KIM et al., 2006).

As ferritinas são proteínas que tem a função de armazenar ferro de uma forma segura e biodisponível, podendo este ser prontamente liberado e utilizado pela célula, de acordo com as suas necessidades, desempenhando importante função de proteção das células contra o excesso de ferro (LAULHERE et al., 1988). Sua síntese é desencadeada em função do excesso de Fe dentro da célula, enquanto que, em condições de deficiência do metal, a ferritina pode ser liberada para o uso celular sendo, portanto, sua expressão modulada em função da ação de fatores externos.

Experimentos em soja e milho demonstraram que o ferro controla a transcrição e tradução de ferritinas de planta (FOBIS-LOISY et al. 1996; WEIL; THEIL, 2000). Elas são altamente conservadas e estão presentes em animais, plantas, fungos e bactérias. Cada proteína é constituída por 24 subunidades do tipo alfa-hélice que formam um reservatório com capacidade para armazenar cerca de 4500 átomos de ferro (LOBRÉAUX et al., 1992; BRIAT; LOBRÉAUX ,1997). Em embriões de ervilha, cerca de 92% do ferro encontrado fica armazenado em ferritinas, o que evidencia o importante papel destas proteínas como fonte de reserva para o desenvolvimento da plântula após a germinação (MARENTES; GRUSAK, 1998). Lobreaux e Briat (1991) relataram que o aumento da absorção de ferro pelas raízes de ervilha acontece em um estágio anterior ao desenvolvimento das sementes.

Estudos demonstraram que as ferritinas são diferencialmente expressas nos tecidos de várias plantas como: soja (LESCURE et al., 1991), milho, (LOBRÉAUX et al.,1993), ervilha (BARCELÓ et al., 1997), *Arabidopsis* (THIMM et al., 2001) e arroz (RABANI et al., 2003). No entanto, a maior parte da ferritina associada ao ferro, está localizada no cloroplasto, indicando sua função na prevenção de danos ao sistema fotossintético (LOBREAUX et al., 1995; BECKER et al., 1998), havendo também evidências da sua presença em mitocôndrias, onde deve desenvolver função semelhante (ZANCANI et al., 2004).

Em *Arabidopsis* foram identificados quatro genes de ferritina. *AtFER1* e *AtFER3* tem a expressão induzida nas raízes e parte aérea em resposta ao excesso de ferro e H_2O_2 , sugerindo que a complexação do ferro com a proteína ferritina serve para proteger as células do estresse oxidativo causado pelo excesso de ferro. (PETIT et al., 2001a). A expressão do gene *AtFER4* também é ativada por excesso de ferro, mas não por H_2O_2 . Já a expressão de *AtFER2* é específica para siliquis

maduras e sementes secas, sugerindo um papel na estocagem de ferro em sementes (PETIT et al., 2001b). Lobreaux et al. (1995) verificaram que a absorção de ferro induz o acúmulo de ferritina e sub-unidades da proteína em plantas de milho. Foram caracterizados dois genes de ferritina na espécie, *ZmFER1*, que é regulado por uma rota independente do ABA (SAVINO et al., 1997) e *ZmFER2* que é regulado por uma rota celular envolvendo o hormônio ácido abscísico (ABA) (FOBIS-LOISY et al. 1995).

No genoma do arroz foram identificados dois genes codificando para ferritina, *OsFER1* e *OsFER2* (GROSS et al., 2003). Através de análises de microarranjo Rabani et al. (2003) evidenciaram um aumento na expressão de ferritina em plantas de arroz cultivadas sob condições de seca, frio e excesso de sal. Qu et al. (2005) evidenciaram um decréscimo no conteúdo de ferro em folhas de plantas de soja transgênica quando comparadas com as não-transformadas, confirmando o papel das ferritinas na homeostase do ferro. Ravet et al. (2009) demonstraram, recentemente, a importância da ferritina na proteção das células contra o estresse oxidativo provocado pelo excesso de Fe, sendo que a sua ausência acarreta em uma redução no crescimento e defeitos no desenvolvimento reprodutivo das plantas.

As famílias gênicas envolvidas na homeostase de ferro podem desempenhar diversas funções dentro das plantas e atuar em diferentes rotas e tecidos, como constatamos através desta revisão, o que torna o estudo deste metabolismo um tanto complexo. Entretanto, o entendimento dos mecanismos de absorção, transporte e armazenamento de Fe na planta são extremamente relevantes, tendo em vista que o desbalanceamento deste processo, ocasionado tanto por excesso, quanto por deficiência de ferro, normalmente resulta em prejuízos ao desenvolvimento das culturas.

Mais especificamente, uma perfeita compreensão dos mecanismos que controlam a entrada, o fluxo e a exclusão de ferro na planta, assim como a caracterização funcional de genes ativados ou reprimidos e suas rotas bioquímicas sob condições de estresse por ferro, tornará possível desvendar os mecanismos ainda desconhecidos que regulam a homeostase deste metal. Principalmente no genoma do arroz que já está totalmente seqüenciado e é tido como modelo entre as poáceas, em função de apresentar importantes relações de sintonia com as outras espécies de cereais (IRGSP, 2005), fato que vem sendo confirmado por meio de comparações entre membros de famílias gênicas dentro e entre espécies, revelando

que a maioria dos genes é altamente conservada entre as espécies mais próximas relacionadas e que as distâncias entre os genes parecem ser correlacionadas ao tamanho do genoma (BENNETZEN, 2000).

As relações de sintonia entre espécies semelhantes permitem que os genes correspondentes ou colineares seqüenciados nos genomas modelos sejam mais facilmente obtidos em espécies com genomas maiores ou até mesmo em espécies menos favorecidas tecnologicamente, levando a um enriquecimento do conhecimento sobre estes indivíduos de forma ampla e eficaz. Através do conhecimento dos mecanismos envolvidos na homeostase do ferro, será possível identificar constituições genéticas mais adaptadas a diferentes fatores abióticos, entre eles a toxidez por ferro, auxiliando os programas de melhoramento no desenvolvimento de genótipos tolerantes a esse estresse. Todas estas respostas, no entanto, estão diretamente relacionadas à regulação da expressão dos genes envolvidos na homeostase do ferro. Do ponto de vista molecular existem ainda, muitos aspectos a serem elucidados, tais como o número e o efeito dos genes envolvidos na expressão de um caráter, bem como a localização e função fisiológica de cada um. Para uma adequada compreensão destes processos, estudos dos padrões da expressão gênica deverão ser intensificados.

2.14 Referências bibliográficas

AKBAR, M.; GUNAWARDENA, I.; PONNAMPERUMA, N. Breeding for soil stresses: **Progress in rainfed lowland rice**. IRRI, Los Banos, The Philippines. p.263–272.1987.

APPLIED BIOSYSTEMS. suporte@appliedbiosystems.com.

AUDEBERT, A.; FOFANA, M. Rice Yield Gap due to Iron Toxicity in West Africa, **J. Agron. Crop Sci.** v.195, n.1, p.66-76, 2009.

AUDEBERT, A., SAHRAWAT, K. L. Mechanisms for iron toxicity tolerance in lowland rice. **J. Plant Nutr.** v. 23, p.1877-1885. 2000.

ASCH, F.; BECKER, M.; KPONGOR, D. S. A quick and efficient screen for resistance to iron toxicity in lowland rice, **J. Plant Nutr. Soil Sci.** v.168, n.6, p.764-773, 2005.

BACHA, R. Avaliação de linhagens e cultivares de arroz irrigado para condições adversas de solo: toxidez por ferro. 19, 1993. In: Reunião da Cultura do Arroz Irrigado, Balneário Camburiú. **Anais**. Florianópolis: EMPASC, 1993.p.156-159.

- BARCELÓ, F.; MIRALLES, F.; AREÁN, C. O. Purification and characterization of ferritin from alfalfa seeds. **Journal of Inorganic Biochemistry**. v. 66, p. 23 – 27. 1997.
- BAUTISTA, N.S.; SOLIS, R.; KAMIJIMA, O.; ISHII, T. RAPD, RFLP and SSLP analyses of phylogenetic relationships between cultivated and wild species of rice. **Genes & Genetic Systems**. v.76, n.2, p.71-79, 2001.
- BECANA M.; MORAN J.F.; ITURBE-ORMAETXE I. Iron-dependent oxygen free radical generation in plants subjected to environmental stress: Toxicity and antioxidant protection. **Plant and Soil**. v.201, p.137-147. 1998.
- BECKER, M.; ASCH, F. Iron toxicity in rice-conditions and management concepts, **J. Plant Nutr. Soil Sci**. v.168, n.4, p.558-573. 2005.
- BECKER, L.A.; ÇETIN, M.S.; HUTKINS, R.W.; BENSON, A.K. Identification of the gene encoding the alternative factor σ^B from *Listeria monocytogenes* and its role in osmotolerance. **J. Bacteriol**. v.180, p.4547–4554. 1998.
- BELOUCHI, A.; KWAN, T.; GROS, P. Cloning and characterization of OsNramp family from *Oryza sativa*, a new family of membrane proteins possibly implicated in the transport of metal ions. **Plant Molecular Biology**. v.33, p.1085-1092. 1997.
- BENCKISER, G., OTTOW, J. C. G., SANTIAGO, S., WATANABE, I. Physiochemical characterization of iron-toxic soils in some Asian countries. IRRI research paper series 85. **The International Rice Research Institute**, Los Banos, The Philippines.1982.
- BENNETT, J. Status of breeding for tolerance of abiotic stresses and prospects for use of molecular techniques. TAC Secretariat, **Food and Agriculture Organization-FAO**, Rome. 2001.
- BENNETZEN, J.L. e KELLOGG, E.A. Do Plants Have a One-Way Ticket to Genomic Obesity? **Plant Cell**. v.9, n.9, p.1509-1514, 1993.
- BENNETZEN, J.L. Comparative sequence analysis of plant nuclear genomes: microcolinearity and its many exceptions. **Plant Cell**. v.12, p.1021–1030. 2000.
- BOHNERT, H.J.; NELSON, D.E.; JENSEN, R.G. Adaptations to environmental stresses. **Plant Cell**. v. 7, p.1099–1111, 1995.
- BOTELHO, C. O **Arroz**. Typografia Levi, 525 p. 1914.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e da Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília, DF: SNDA/DNDV/CLAV. 365p, 1992.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Departamento Nacional de Pesquisa Agropecuária. Divisão de Pesquisa Pedológica. **Levantamento de reconhecimento dos solos do Estado do Rio Grande do Sul**. Recife. 341p. (Boletim Técnico, 30), 1973.

BRIAT, J.F.; LOBREAUX, S. Iron transport and storage in plants. **Trends in Plant Science**. v. 2, p.187-193. 1997.

BRUGGEMANN, W.; MASS-KANTEL, K.; MOOG, P. R. Iron uptake by leaf mesophyll cells: the role of the plasma membrane-bound ferric-chelate reductase. **Planta**. v.190, p.151-155.1993.

BUGHIO, N.; YAMAGUCHI, H.; NISHIZAWA, N. K.; NAKANISHI, H. Mori S Cloning an iron regulated metal transporter from rice. **Journal of Experimental Botany**. v.53, p.1677-1682. 2002.

CARVALHO, F. I. F.; LORENCETTI, C.; MARCHIORO, V. S.; SILVA, S.A. **Condução de populações no melhoramento genético de plantas**. Editora e Gráfica Universitária - UFPel, 2003.

CATALDO, D.A.; MCFADDEN, K.M.; GARLAND, T. R.; WILLDUNG, R.E. Organic constituents and complexation of nickel (II), iron (III), cadmium (II), and plutonium (IV) in soybean xylem exudates. **Plant Physiology**. v.86, p.734-39. 1988.

CELLIER, M. F. M.; BERGEVIN, I.; BOYER, E.; RICHER, E. Polyphyletic origins of bacterial Nramp transporters. **Trends in Genetics**. v.17, n.7, p.365-370. 2001.

CHANG, T. T. Rice. In: SIMMONDS, N. W. **Evolution of crop plants**. London, Longmans, p.98-104.1976a.

CHANG, T. T. The rice cultures. **Phil. Trans. R. Soc.** London, v.275, p.143-157, 1976b.

CHRISTOU, P. Rice Biotechnology and Genetic Engineering. **Technomic Publication**: Basel, Switzerland. 1994.

COLANGELO, E. P.; GUERINOT, M. L. Put the metal to the petal: metal uptake and transport throughout plants. **Plant Biol**. v.9, p. 322 e 330. 2006.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Disponível em. < www.conab.gov.br>. Acesso em 10/03/2010a.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento de safra brasileira: grãos, sexto levantamento, publicação mensal (março), Brasília. 42 p. 2010.

CONNOLLY, E.L.; FETT J.P.; GUERINOT, M.L. Expression of the IRT1 metal transporter is controlled by metals at the levels of transcript and protein accumulation. **Plant Cell**. v.14, p.1347-1357. 2002.

- CRESTANI, M.; SOUZA, V.Q.; SILVA, J. A. G.; HARTWIG, I.; LUCHE, H. S. de; SOUSA, R. O de.; CARVALHO, F. F. I. de. Comportamento de genótipos de arroz irrigado submetidos ao estresse por ferro em condições de hidroponia. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**. v. 9, p.85-93, 2009.
- CROUGHAN, T. P. et al. Herbicide-resistant rice offers potential solution to red rice problem. **Louisiana Agriculture**, v.39, n.4, p.10-12, 1996.
- CURIE, C.; ALONSO, J.M.; JEAN, M.L.; ECKER, J.R.; BRIAT, J.F. Involvement of NRAMP1 from *Arabidopsis thaliana* in iron transport. **Biochemical Journal**. v.347, p.749-755. 2000.
- CURIE, C.; BRIAT, J.F. Iron transport and signaling in plants. **Annu. Rev. Plant Biol.** v.54, p.183–206. 2003.
- CURIE, C.; PANAVIENE, Z.; LOULERGUE, C.; DELLAPORTA, S.L.; BRIAT, J.F.; WALKER, E.L. Maize yellow stripe1 encodes a membrane protein directly involved in Fe(III) uptake. **Nature**. v.409, p.346-349. 2001.
- DEVOS, K. Updating the "Crop Circle." **Current Opinion in Plant Biology**. v.8, n.2, p.155-162, 2005.
- DIDONATO, R. J.; ROBERTS, L. A.; SANDERSON, T.; EISLEY, R.B.; WALKER, E.L. *Arabidopsis Yellow Stripe-Like2* (YSL2): a metal-regulated gene encoding a plasma membrane transporter of nicotianamine–metal complexes. **The Plant Journal**. v.39, p.403-414. 2004.
- DOBERMANN, A.; FAIRHURST, T. Rice: Nutrient disorders and nutrient management. **The International Rice Research Institute**, Manila, Philippines.2000.
- DURRET, T. P.; GASSMANN. W.; ROGERS, E. E. The FRD3-mediated Efflux of Citrate into the Root Vasculature is Necessary for Efficient Iron Translocation. **Plant Physiology**. v.144, p.197–205. 2007.
- EATON, J.W.; QIAN, M. Molecular bases of cellular iron toxicity. **Free Radical Biology & Medicine**. v.32, p.833-840. 2002.
- ECKHARDT, U.; MAS MARQUES, A.; BUCKHOUT, T.J. Two-iron regulated cation transporters from tomato complement metal uptake-deficient yeast mutants. **Plant Mol Biol**. v.45, p.437–448. 2001.
- EIDE, D.; BRODERIUS, M.; FETT, J.P.; GUERINOT, M.L. A novel iron-regulated metal transporter from plants identified by functional expression in yeast. **PNAS**. v.93, p. 5624-5628. 1996.

FAGERIA, N.K.; BARBOSA FILHO, M.P.; CARVALHO, J.R.P.; RANGEL, P.H.N.; CUTRIM, V.A. Avaliação preliminar de cultivares de arroz para tolerância à toxidez de ferro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v.19, n.10, p. 1278-1280. 1984.

FAGERIA N.K.; SLATON N.A.; BALIGAR V.C. Nutrient management for improving lowland rice productivity and sustainability. **Advances in Agronomy**. v.80, p.63–152. 2003.

FANG, W.C.; WANG, J.W.; LIN, C.C.; KAO, C.H. Iron induction of lipid peroxidation and effects on antioxidative enzyme activities in rice leaves. **Plant Growth Regulation**. v. 35, p.75-80. 2001.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations Statistical Database, disponível em <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx>, acessado em 20 de março de 2010.

FENG, H.; F. AN, F.; ZHANG, S.; JI, Z.; LING, H-Q.; ZUO, J. Light-regulated, tissue- and cell differentiation-specific expression of the Arabidopsis Fe(III)-chelate reductase gene AtFRO6, **Plant Physiol**. v.140, p.1345–1354. 2006.

FREEMAN, W. M.; WALKER, S. J.; VRANA, K. E. Quantitative RT-PCR: Pitfalls and Potential. **BioTechniques**. v. 26, n.1, p.112-125. 1999.

FOBIS-LOISY, I.; AUSSEL, L.; BRIAT, J.-F. Post-transcriptional regulation of plant ferritin accumulation in response to iron as observed in the maize mutant *ys1*. **FEBS Letters**. v.397, p.149–154. 1996.

FOBIS-LOISY, I.; LORIDON, K.; LOBREAUX, S.; LEBRUN, M.; BRIAT, J.F. Structure and differential expression of two ferritin genes in response to iron and abscisic acid. **European Journal Biochemistry**. v.231, p. 609-619. 1995.

FUJITA, M.; FUJITA, Y.; NOUTOSHI, Y.; TAKAHASHI, F.; NARUAKA, Y.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks. **Current Opinion in Plant Biology**. v.9, n.4, p.436-442. 2006.

GENDRE, D.; CZERNIC, P.; CONEJERO, G.; PIANELLI, K.; BRIAT, J.F.; LEBRUN, M.; MAR, S. *TcYSL3*, a member of the YSL gene family from the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*, encodes a nicotianamine-Ni/Fe transporter. **The Plant Journal**. v.49, p.1–15. 2007.

GEORGE, E. F.; HALL, A. M.; DE KLERK, G-J. **Plant Propagation by Tissue Culture**. 3. ed. Netherlands, 2008. 479p.

GRIST, D. H. **Rice**. 5.ed. London: Longman, 1978. 601p.

GROSS, J.; STEIN, R.J.; FETT-NETO, A.G.; FETT, J.P. Iron homeostasis related genes in rice. **Genetics and Molecular Biology**. v.26. n.4, p.477-497. 2003.

GRUSAK, M.A. Enhancing mineral content in plant food products. **Journal of the American College of Nutrition**. v. 21, p.178S-183S. 2002.

GUNAWARDENA, I.; VIRMANI, S. S.; SUMO, F. J. Breeding rice for tolerance to iron toxicity. *Oryza* 19, 5–12. Gupta, A. S., Webb, R. P., Holaday, A. S., Allen, R. D. Overexpression of superoxide dismutase protects plants from oxidative stress. **Plant Physiol.** v.103, p.1067–1073.1982.

HARMSSEN, K. e VAN BREEMEN, N. Translocation of iron in sulfate acid soils: II. Reduction and diffusion of dissolved ferrous iron. **Soil Sci. Soc. Am. Proc.** v.39, p.1148–1153.1975.

HE, G-X.; KURODA, T.; MIMA, T.; MORITA, Y.; MIZUSHIMA, T.; TSUCHIYA, T. An H⁺-coupled multidrug efflux pump, PmpM, a member of the MATE family transporters, from *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Bacteriology**, v.186,p. 262-265, 2004.

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

HIGUCHI, K.; SUZUKI, K.; NAKANISHI, H.; YAMAGUCHI, H.; NISHIZAWA, N.K.; MORI, S. Cloning of nicotianamine synthase genes, novel genes involved in the biosynthesis of phytosiderophores. **Plant Physiol.** v. 119, p.471–480. 1999.

HIGUCHI, R., DOLLINGER, G.; WALSH, P. S.; GRIFFITH, R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. **BioTechnology**. v.10, p.413-417.1992.

HOWELER, R.H. Iron-induced orange disease of rice in relation to physico-chemical changes in a flooded soil. Soil Science Society of America. **Proceedings**, Madison, v.37, p. 898-993, 1973.

ILIC, K.; SAN MIGUEL, P.J.; BENNETZEN, J.L. A complex history of rearrangement in an orthologous region of the maize, sorghum, and rice genomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v.100, n.21, p.12265-12270, 2003.

INOUE, H.; HIGUCHI, K.; TAKAHASHI, M.; NAKANISHI, H.; MORI, S.; NISHIZAWA, N.K. Three rice nicotianamine synthase genes, OsNAS1, OsNAS2, and OsNAS3 are expressed in cells involved in long-distance transport of iron and differentially regulated by iron. **Plant Journal**. v.36, p.366–381. 2003.

INTERNATIONAL BRACHYPODIUM INITIATIVE (BII). Genome sequencing and analysis of the model grass *Brachypodium distachyon*. **Nature**. v.463, n.08747, p.763-768, 2010.

INTERNATIONAL RICE GENOME SEQUENCING PROJECT (IRGSP). The map-based sequence of the rice genome. **Nature**. v.1, n.7052, p.793-800, 2005.

INTERNATIONAL RICE - RESEARCH INSTITUTE. **Standard evaluation system for rice**. Los Banõs, IRRI, 1975.

INSTITUTO RIO-GRANDENSE DO ARROZ (IRGA). **O arroz no Rio Grande do Sul**. Lavoura Arrozreira. - Edição especial. Cachoeirinha. v.58, n.452, 44p. 2010.

INSTITUTO RIO-GRANDENSE DO ARROZ (IRGA). Dados estatísticos referentes a safra dos anos de 2009/2010. Disponível em: <http://www.irga.rs.gov.br>. Acesso em: 2010.

INSTITUTO RIO-GRANDENSE DO ARROZ (IRGA). **Arroz irrigado no RS**: área cultivada, produção, nº de engenhos e beneficiamento. Disponível em: <http://www.irga.rs.gov.br>. Acesso em: 2004.

ISHIMARU, Y.; SUZUKI, M.; TSUKAMOTO, T.; SUZUKI, K.; NAKAZONO, M.; KOBAYASHI, T.; WADA, Y. WATANABE, S.; MATSUHASHI, S.; TAKAHASHI, M.; NAKANISHI, H.; MORI, S.; NISHISAWA, N.K. Rice plants take up iron as an Fe³⁺-phytosiderophore and as Fe²⁺. **Plant Journal**. v.45, p. 335-346. 2006.

JAIN, M.; NIJHAWAN, A.; TYAGI, A. K.; KHURANA, J. P. Validation of housekeeping genes as internal control for studying gene expression in rice by quantitative real-time PCR. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 345, p. 646–651. 2006.

JEAN, M. L.; SCHIKORA, A.; MARI, S.; BRIAT, J.F.; CURIE, C. A loss-offunction mutation in AtYSL1 reveals its role in iron and nicotianamine seed loading. **The Plant Journal**. v.44, p.769–782. 2005.

KÄMPF, N. O ferro no solo. In: REUNIÃO SOBRE FERRO EM SOLOS INUNDADOS, 1., Goiânia 1988. **Anais...** Goiânia, CNAF/Embrapa, p. 35-71. 1988.

KELLOG, E.A. Evolutionary History of the Grasses. **Plant Physiology**. v.125, n.3, p.1198-1205, 2001.

KIM, S.A. e GUERINOT, M.L. Mining iron: Iron uptake and transport in plants. **Federation of European Biochemical Societies Letters**. v. 581, p.2273–2280. 2007.

KIM, S.A.; PUNSHON, T.; LANZIROTTI, A.; LI, L.; ALONSO, J.M.; ECKER, J.R.; KAPLAN, J.; GUERINOT, M.L. Localization of iron in *Arabidopsis* seed require the vacuolar membrane transporter VIT1. **Science**. v. 314, p.1295-1298. 2006.

KOIKE, S.; INOUE, H.; MIZUNO, D.; TAKAHASHI, M.; NAKANISHI, H.; MORI, S.; NISHIZAWA, N.K. OsYSL2 is a rice metal-nicotianamine transporter that is regulated by iron and expressed in the phloem. **The Plant Journal**. v.39, p.415–424. 2004.

KRÜEGER, C.; BERKOWITZ, O.; STEPHAN, U.W.; HELL, R. A metal-binding member of the late embryogenesis abundant protein family transports iron in the phloem of *Ricinus communis* L. **Journal of Biological Chemistry**. v.277, p.25062-25069. 2002.

LABATE, C. A.; CALDAS, D. G. G.; MOON, D. H.; DE CARVALHO, M. C. C. G. Genômica Funcional – Apostila. Universidade de São Paulo. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Piracicaba – SP. 2007.

LANQUAR, V.; LELIEVRE, F.; BOLTE, S.; HAMES, C.; ALCON, C.; NEUMANN, D.; VANSUYT, G.; CURIE C.; SCHRÖDER, A.; KRAMER, U.; BARBIE-BRYGOO, H.; THOMINE, S. Mobilization of vacuolar iron by AtNRAMP3 and AtNRAMP4 is essential for seed germination on low iron. **European Molecular Biology Organization**. v.24, p.4041-4151.2005.

LANTIN, R. S. e NEUE, H. U. Iron toxicity: a nutritional disorder in wetland rice. 17th Irrigated Rice Meeting. Brazil. 26–30 Sep.1989. **Lavoura-Arrozeira**. v.42, p.3–8.1989.

LANTIN, R.S.; NEUE, H.V. **Iron toxicity: a nutritional disorder in wetland rice**. In: REUNIÃO DA CULTURA DO ARROZ IRRIGADO, 18, Pelotas, 1988. Anais. Pelotas: 1988. 16p. Palestra apresentada.

LARCHER, W. **Physiological plant ecology**. Ecophysiology and stress physiology of functional groups. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2003. 4a ed.

LAULHERE, J.P.; LESCURE, A.M.; BRIAT, J.F. Purification and characterization of ferritins from maize, pea, and soybean seeds. **The Journal of Biological chemistry**. v. 263, p.10289 – 10294. 1988

LESCURE, A-M.; PROUDHON, D.; PESEY, H.; RAGLAND; THEIL, E. C.; BRIAT, J-F. Ferritin gene transcription is regulated by iron in soybean cell cultures. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. v.88, p.8222 – 8226. 1991.

LINDSAY, W. L. **Chemical equilibria in soils**. New York. John Wiley, p.449. 1979.

LING, H-Q.; KOCH, G.; BÄUMLEIN, H.; GANAL, M. W. Map-based cloning of *chloronerva*, a gene involved in iron uptake of higher plants encoding nicotianamine synthase. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. v. 96, p.7098–7103, 1999.

LOBREAUX, S. e BRIAT, J.F. Ferritin accumulation and degradation in different organs of pea (*Pisum sativum*) during development. **Biochem. J**. v.274, p.601–606. 1991.

LOBRÉAXU. S.; MASSENET, O.; BRIAT. J-F. Iron induces ferritin synthesis in maize plantlets. **Plant Molecular Biology**. v.19, p. 563 – 575.1992.

LOBRÉAXU, S.; HARDY, T.; BRIAT, J-F. Absciscic acid is involved in the iron induced regulation of maize ferritin. **Embo Journal**. v.12, p. 651 – 657. 1993.

LOBREAUX, S.; THOIRON, S.; BRIAT, J.F. Induction of ferritin synthesis in maize leaves by an iron-mediated oxidative stress. **Plant Journal**. v.8, p.443–449. 1995.

LONDO, J.P.; CHIANG, Y.C.; HUNG, K.H.; CHIANG, T-Y.; SCHAALL, B, A. Phylogeography of Asian wild rice, *Oryza rufipogon*, reveals multiple independent domestications of cultivated rice, *Oryza sativa*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v.103, n. 25, p. 9578-9583, 2006.

LUO, A.; JING, G.; WU, P.; NI, J.; JIANG, S.; ZHANG, Y. Rice genotype differences in nutrient status under excessive ferric iron conditions. **J. Plant Nutr.** v.20, p.1361-1373.1997.

MA, J. e BENNETZEN, J.L. Recombination, rearrangement, reshuffling, and divergence in a centromeric region of rice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.10, n.2, p.383-388, 2005.

MACLEAN, J. L.; DAWE, D.C.; HARDY, B.; HETTEL, G.P. **Rice Almanac**. Third Edition, IRRI, 2002.

MAGALHÃES JR, A. M de; FAGUNDES, P. R. R; GOMES, A.S; FRANCO, D. F.; SEVERO, A. Seleção de linhagens de arroz irrigado do programa de melhoramento da Embrapa á toxicidade por ferro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ARROZ IRRIGADO, 4 ; REUNIÃO DA CULTURA DO ARROZ IRRIGADO, 26, 2005, Santa Maria. **Anais**. Santa Maria: UFSM, 2005. p. 204-206.

MAGALHÃES JR, A. M de; FAGUNDES, P. R. R; GOMES, A.S; FRANCO, D. F.; SEVERO, A. Avaliação de linhagens de arroz irrigado à toxicidade por ferro do programa de melhoramento da Embrapa. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ARROZ IRRIGADO, 5 ; REUNIÃO DA CULTURA DO ARROZ IRRIGADO, 27, 2007, Pelotas. **Anais**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2007. p. 108-111.

MAGALHÃES JUNIOR, A. M. de ; COSTA de OLIVEIRA, A. Arroz. In: BARBIERI, R. L. ; STUMPF, E. R. T. **Origem e evolução das plantas cultivadas**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2008. p.186-208.

MAHADEVAPPA, M.; BULBULE, A. V.; SIDDARAMAPPA, R.; KULKARNI, R. S. Field screening of rice cultivars for growth, yield and nutrient uptake in acidic soil. **Plant Soil Sci.** v.45, p.959–965.1991.

MAIA, L.C. Desenvolvimento de ferramenta e análise *in silico* da ocorrência de microssatélites (single sequence repeat) no genoma do arroz. **Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Pelotas**. 2007.

- MARENTES, E.; GRSAK, M.A. Iron transport and storage within the seed coat and embryo of developing seeds of pea (*Pisum sativum* L.). **Seed Science Research**. v.8, p. 367-375. 1998.
- MARSCHNER. H. Mineral nutrition of higher plants. **Academic Press**, San Diego, USA. 1995.
- MARSCHNER, H.; RÖHMELD, V. Strategies of plants for acquisition of iron. **Plant Soil**. v. 165, p.375–88. 1994.
- MENGEL, K.; KIRKBY, E.A. **Principles of plant nutrition**. Bern: International Potash Institute, 1987. 687p.
- MEURER, E.J. **Fundamentos de química do solo**. Porto Alegre: Gênese, 2000, 174p.
- MIZUNO, D.; HIGUCHI, K.; SAKAMOTO, T.; NAKANISHI, H.; MORI, S.; NISHIZAWA, N.K. Three nicotianamine synthase genes isolated from maize are differentially regulated by iron nutritional status. **Plant Physiol**. v.132, p.1989–1997. 2003.
- MOORE, G.; DEVOS, K.M.; WANG, Z.; GALE, M.D. Cereal genome evolution. Grasses, line up and form a circle. **Current Biology**. v.5, n.7, p.737-739, 1995.
- MORAES, J. F. V.; FREIRE, C. J. S. Variação do pH, da condutividade elétrica e da disponibilidade dos nutrientes nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio e magnésio em quatro solos submetidos à inundação. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Série Agronomia, Brasília, v.9, p.35-43, 1974.
- MORI, S.; NISHIZAWA, N.K.; HAYASHI, H.; CHINO, M.; YOSHIMURA, E.; ISHIHARA, J. Why are young rice plants highly susceptible to iron deficiency? **Plant Soil**. v.130, p.143–156. 1991.
- MORISHIMA. H; SANO. Y; OKA. H.I. Evolutionary studies in cultivated rice and its wild relatives. Oxford Surv. **Evol. Biol**. v.8, p.135-184. 1992.
- MURAD, E. e FISCHER, W.R. The geobiochemical cycle of iron. In: Stucki, J.W., Goodman, B.A., Schwertmann, U. (Eds.), **Iron in Soils and Clay Minerals**. D. Reidel Publishing Company, p. 1– 18. 1988.
- MURATA, Y.; MA, J.F.; YAMAJI, N.; UENO, D.; NOMOTO, K.; IWASHITA, T. 2006. A specific transporter for iron (III)–phytosiderophore in barley roots. **The Plant Journal**. v.46, p.563–572. 2006.
- NARAYANAN, N. N.; VASCONCELOS, W.M.; GRUSAK, A.M. Expression profiling de *Oryza sativa* metal homeostasis genes in different rice cultivars using a cDNA macroarray. **Plant Physiology and Biochemistry**. v.45, p.277-286. 2007.

NCBI Taxonomy: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/> - acessado em 15 de março de 2010.

NEVO, Y.; NELSON, N. The mutation F227I increases the coupling of metal ion transport in DCT1, **J. Biol. Chem.** v.27951, p.53056–53061. 2004.

PEREIRA, J. A. **A cultura do arroz no Brasil: subsídios para a sua história.** Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2002. 226p.

PETIT, J-M.; BRIAT, J-F.; LOBREAUX, S. Structure and differential expression of the four members of the Arabidopsis thaliana ferritin gene family. **Biochem. J.** v.359, p.575–582. 2001a.

PETIT, J-M.; VAN WUYTSWINKEL, O.; BRIAT, J-F.; LOBREAUX, S. Characterization of an Iron-dependent regulatory sequence involved in the transcriptional control of *AtFer1* and *ZmFer1* plant ferritin genes by iron. **J Biol Chem.** v.276, p.5584–5590. 2001b.

PICH, A.; MANTEUFFEL, R.; HILLMER, S.; SCHOLZ, G.; SCHMIDT, W. Fe homeostasis in plant cells: does nicotianamine play multiple roles in the regulation of cytoplasmic Fe concentration? **Planta.** v.213, p.967–976. 2001.

PINTO, L. F. S.; PAULETO, E. A.; GOMES, A. da S.; SOUZA, R. O. **Caracterização de solos de várzea.** In: Gomes, A.S.; Pauletto, E.A. (Eds). Manejo do solo e da água em áreas de várzea. Pelotas: EMBRAPA CLIMA TEMPERADO, 1999. Cap.1, p.11-36.

PINTO, L. F. S.; NETO, J. A. L.; PAULETO, E. A.; **Solos de várzea do Sul do Brasil cultivados com arroz irrigado.** In: Gomes, A.S.; Magalhães Jr., A. M. (Eds). Arroz Irrigado na Sul do Brasil. Brasília, DF. 2004. Cap.3, p.75-95.

PONNAMPERUMA, F.N. The chemistry of submerged soils. **Advanced Agronomy.** v.24, p.29-96, 1972.

QU, L. Q.; YOSHIHARA, T.; OYAMA, A.; GOTO, F.; TAKAIWA, F. Iron accumulation does not parallel the high expression level of ferritin in transgenic rice seeds. **Planta.** v.222, p.225 – 233. 2005.

RABANI, M. A.; MARUYAMA, K.; ABE, H.; KAN, M. A.; KATSURA, K.; ITO, Y.; YOSHIWARA, K.; SEKI, M.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI. K. Monitoring Expression Profiles of Rice Genes under Cold, Drought, and High-Salinity Stresses and Absciscic Acid Application Using cDNA Microarray and RNA Gel-Blot Analyses. **Plant Physiology.** v.133, p.1755 – 1767. 2003.

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

ROBERTS, L.A.; PIERSON, A.J.; PANAVIENE, Z.; WALKER, E.L. *Yellow stripe1*: expanded roles for the maize iron-phytosiderophore transporter. **Plant Physiol**. v.135, p.112–120. 2004.

ROBINSON, N.J.; PROCTOR, C.M.; CONNOLLY, E.L.; GUERINOT, M.L. A ferric chelate reductase for iron uptake from soils. **Nature**. v.397, p.694-697.1999.

RÖMHELD V. Different strategies for iron acquisition in higher plants. **Physiologia Plantarum**. v. 70, p.321–234. 1987.

RÖMHELD, V.; MARSCHNER, H. Mobilization of iron in the rhizosphere of different plant species. *Adv. Plant Nutr.* v.2, p.155± 204. 1986.

SAHRAWAT, K. L. Iron toxicity in wetland rice and the role of other nutrients. **Journal Plant Nutr.** v..27, p.1471-1504, 2004.

SAHRAWAT, K. L.; DIATTA, S. Nutrient management and season affect soil iron toxicity, in West Africa Rice Development Association: **Annual Report 1995**, p. 34–35.1996.

SALSE, J.; PIÉGU, B.; COOKE, R.; DELSENY, M. New *in silico* insight into the synteny between rice (*Oryza sativa* L.) and maize (*Zea mays* L.) highlights reshuffling and identifies new duplications in the rice genome. **The Plant Journal**, v.38, n.3, p. 396-409, 2004.

SANTOS, L. S. e COSTA DE OLIVEIRA, A. Rice iron metabolism:from source to solution. **Journal of Crop Science and Biotechnology**. v. 10, p. 64-72, 2007.

SAVINO, G.; BRIAT, J.-F.; LOBREAUX, S. Inhibition of the Iron-induced *ZmFer1* Maize Ferritin Gene Expression by Antioxidants and Serine/Threonine Phosphatase Inhibitors. **The Journal of Biological Chemistry**. v.272, p. 33319 – 33326. 1997.

SCHAAF, G.; LUDEWIG, U.; ERENOGLU, B.E.; MORI, S.; KITAHARA, T.; VON WIREN, N. ZmYS1 functions as a proton-coupled Symporter for phytosiderophore- and nicotianamine-chelated metals. **J. Biol. Chem.** v.279, p.9091–9096. 2004.

SCHMIDT, W. Mechanisms and regulation of reduction based iron uptake in plants. **New Phytology**. v. 141, p.1–26. 1999.

SHIMIZU, H.; SATO, K.; BERBERICH, T.; MIYAZAKI, A.; OZAKI, R.; IMAI, R.; KUSANO, T. LIP19, a basic region leucine zipper protein, is a Fos-like molecular switch in the cold signaling of rice plants. **Plant Cell Physiol**. v.46, p.1623–1634. 2005.

SILVA, M. V. O melhoramento do arroz em Portugal. **Vida Agrícola**. Lisboa, v.19, não paginado, 1956.

SILVEIRA, V. C.; OLIVEIRA, A. P.; SPEROTTO, R. A.; ESPINDOLA, L. S.; AMARAL, L.; DIAS, J. F.; CUNHA, J. B.; FETT, J. P. Influence of iron on mineral status of two rice (*Oryza sativa* L.) cultivars. **Brazilian Journal of Plant Physiology**. v.19, p.127-139. 2007

SINHA, S.; GUPTA, M.; CHANDRA, P. Oxidative Stress Induced by Iron in *Hydrilla verticillata* (L.f.) Royle: Response of Antioxidants. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v.38, p.286-291.1997.

SOSBAI – Sociedade Sul-Brasileira de Arroz Irrigado **Arroz irrigado: recomendações técnicas da pesquisa para o Sul do Brasil**. Pelotas: SOSBAI, 2007. 164 p.

SOUSA, R. O. de; CAMARGO, F. A. O.; VAHL, L. C. Solos alagados – Reações de Redox. In: MEURER, E.J. (3 ed.). **Fundamentos de química do solo**. Editora Evangraf, Porto Alegre, p.185-211. 2006.

SOUSA, R. O. de; GOMES, A. da S.; VAHL, L. C. Toxidez por ferro em arroz irrigado. In: GOMES, A da S. e MAGALHÃES JÚNIOR, A. M. de (eds.). **A cultura do arroz irrigado no Sul do Brasil**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2004. pág. 305-334.

SOUZA-SANTOS, P.; RAMOS, R. S.; FERREIRA, S. T.; CARVALHO-ALVES, P.C. Iron-induced oxidative damage of corn root plasma membrane H⁺-ATPase. **Biochimica et Biophysica Acta**. v.1512, p.357-366. 2001.

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM. **SAS: Statistical Analysis System-Getting Started with the SAS Learning Edition**. Cary, NC: SAS Institute Inc., 2002. 86p.

STEPHAN, U.W.; SCHMIDKE, I.; STEPHAN, V.W.; SCHOLZ, G. The nicotianamine molecule is made-to-measure for complexation of metal micronutrients in plants.**Biometals**. v. 9, p.84–90.1996.

SPEHAR, C. R.; MAKITA, M. Tolerância ao alumínio em plântulas de soja e sua utilização. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 12, p. 1927-1932, dez. 1994.

SPEROTTO, R.A.; RICACHENEVSKY, F. K.; FETT, J. P. Iron deficiency in rice shoots: identification of novel induced genes using RDA and possible relation to leaf senescence. **Plant and Cell Reports**. v.26, p.1399-1411.2007.

SPEROTTO, R. A.; BOFF, T.; DUARTE, G. L.; FETT, J. P. Increased senescence-associated gene expression and lipid peroxidation induced by iron deficiency in rice roots. **Plant and Cell Reports**. v.27, p.183-195.2008.

- SUZUKI, K.; HIGUCHI, K.; NAKANISHI, H.; NISHIZAWA, H-K.; MORI, S. Cloning of nicotianamine synthase genes from *Arabidopsis thaliana*. **Soil Sci Plant Nutr.** v. 45, n.4, p.993-1002. 1999.
- TADANO, T. Devices of rice roots to tolerate high iron concentration in growth media. **Japanese Agricultural Research Quart (JARQ)**. v. 9, n.1, p.34–39.1975.
- TADANO, T. Studies on the methods to prevent iron toxicity in the lowland rice. **Mementos of the Faculty of Agriculture Hokkaido University**. v.10, p.22–68.1976.
- TADANO, T. e YOSHIDA, S. Chemical changes in submerged soils and their effect on rice growth, in IRRI: Soils and Rice. **The International Rice Research Institute**, Manila, The hilippines, p. 399–420. 1978.
- TAIZ, L., ZEIGER, E. Plant Physiology. Sinauer Associates, 2a ed.1998.
- TAIZ, L., ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.
- TAKAGI, S.; NOMOTO, K.; TAKEMOTO, T., Physiological aspect of mugineic acid, a possible phytosiderophore of graminaceous plant. **J. Plant Nutr.** v.7, p.469-477. 1984.
- TAKAHASHI, M.; TERADA, Y.; NAKAI, I.; NAKANISHI, H.; YOSHIMURA, E.; MORI, S.; NISHIZAWA, N. Role of nicotianamine in the intracellular delivery of metals and plant reproductive development. **Plant Cell**. v. 15, p.1263–1280. 2003.
- 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**. v.19, p.466-469.2001.
- TEDESCO, M. J.; GIANELLO, C.; BISSANI, C. A.; BOHNEN, H.; VOLKWEISS, S. J. **Análises de solo, planta e outros materiais**. 2. ed. Porto Alegre: Departamento de Solos, Faculdade de Agronomia, UFRGS, 1995. 174p. (Boletim técnico, n.5).
- TERRES, A. L.; GALLI, J.; FAGUNDES, P. R. R.; MACHADO, M. O.; MAGALHÃES JR., A. M. DE; MARTINS, J. F.; NUNES, C. D. M.; FRANCO, D. F.; AZAMBUJA, I. H. V. **Arroz irrigado no Rio Grande do Sul: generalidades e cultivares**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 1998. 58p. (Embrapa Clima Temperado. Circular Técnica, 14).
- THIMM, O.; ESSIGMANN, B.; KLOSKA, S.; ALTMANN, T.; BUCKHOUT, T. J. Response of Arabdopsis to iron deficiency stress as revealed by microarray analysis. **Plant Physiology**. v. 127, p.1030 – 1043. 2001.
- THOMINE, S.; SCHROEDER, J.I. Plant Metal Transporters with Homology to Proteins of the NRAMP Family. In: **The Nramp Family**. Editor: Mathieu Cellier. Publisher: Landes Bioscience, Georgetown, Texas. 11 pages. 2004.

THOMINE, S.; LELIEVRE, F.; DEBARBIEUX, E.; SCHROEDER, J.I.; BARBIER-BYGOO, H. AtNRAMP3, a multispecific vacuolar metal transporter involved in plant responses to iron deficiency. **Plant Journal**. v.34, p.685–695. 2003.

THOMINE, S.; WANG, R.; WARD, J.M.; CRAWFORD, N.M.; SCHROEDER, J.I. Cadmium and iron transport by members of a plant metal transporter family in *Arabidopsis* with homology to Nramp genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v.97, p.4991-4996. 2000.

VAHL, L.C. **Toxidez de ferro em genótipos de arroz irrigado por alagamento**. Porto Alegre. Tese (Doutorado em Ciência do Solo), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1991.

VAHL, L. C.; LOPES, S. I. G. Nutrição de plantas. In: PESQUE, S. T.; NEDEL, J. L.; BARROS, A. C. S. A. (Eds.) **Produção de arroz irrigado**. Pelotas: Editora e Gráfica Universitária, UFPel, 3ª ed., 2004, p.149-206.

VAHL, L. C.; SOUSA, R. O. **Aspectos físico-químicos de solos alagados**. In: Gomes, A.S.; Magalhães Jr., A. M. (Eds). *Arroz Irrigado na Sul do Brasil*. Brasília, DF. 2004. Cap.3, p.97-118.

VAN MENSVOORT, M.E.; LANTIN, RS; BRINKMANN, R.; VAN BREEMEN, N. **Toxicities of wetland soils**. In: INTERNATIONAL RICE RESEARCH INSTITUTE. *Wetland soils: characterization, classification and utilization*. Los Baños: IRRI, 1985. p.308-19.

VAROTTO, C.; MAIWALD, D.; PESARESI, P.; JAHNS, P.; SALAMINI, F.; LEISTER, D. The metal ion transporter IRT1 is necessary for iron homeostasis and efficient photosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. **Plant J**. v. 31, p.589–599. 2002.

VARSHNEY, R.K.; GRANER, A.; SORRELLS, M.E. Genomics-assisted breeding for crop improvement. **Trends in Plant Science**. v.10, n.12, p.621-630, 2005a.

VARSHNEY, R.K.; HOISINGTON, D.A.; TYAGI, A.K. Advances in cereal genomics and applications in crop breeding. **Trends in Biotechnology**. v.4, n.11, p.490-499. 2006.

VAUGHAN, D. A.; CHANG, T.T. Collecting the rice gene pool. In: GUARINO, L.; RAMANATHA RAO, V.; REID, R. **Collecting plant genetic diversity: technical guidelines**. Wallingford: CAB International, 1995. p.659-675.

VERT, G.; GROTZ, N.; DEDALDECHAMP, F.; GAYMARD, F.; GUERINOT, M.L.; BRIAT J.F.; CURIE, C. IRT1, an *Arabidopsis* transporter essential for iron uptake from the soil and for plant growth. **The Plant Cell**. v.14, p.1223-1233. 2002.

VERT, G.; BRIAT, J. F.; CURIE, C. Arabidopsis IRT2 gene encodes a root-periphery iron transporter. **Plant J.** v.26, p.181–189. 2001.

VIEIRA, N. R. A.; SANTOS, A. B.; SANT'ANA, E. P. **A cultura do arroz no Brasil**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 633p. 1999.

WARDA. Annual Report 2000. West Africa Rice Development Association, Bouake, Côte d'Ivoire. 2001.

WATERS, B.M.; CHU, H.H.; DIDONATO, R.J.; ROBERTS, L.A.; EISLEY, R.B.; LAHNER, B.; SALT, D.E.; WALKER, E.L. Mutations in Arabidopsis Yellow Stripe-Like1 and Yellow Stripe-Like3 reveal their roles in metal ion homeostasis and loading of metal ions in seeds. **Plant Physiol.** v.141, p.1446-1458.2006.

WATERS, B.M.; BLEVINS, D.G.; EIDE, D.J. Characterization of FRO1, a Pea Ferric-Chelate Reductase involved in root iron acquisition. **Plant Physiology.** v.129, p.85-94. 2002.

WEIL, J. e THEIL, E. C. Identification and characterization of the iron regulatory element in the ferritin gene of a plant (soybean). **Journal Biological Chemistry.** v. 275, p.17488–17493. 2000.

WINTZ, H.; FOX, T.; WU, Y.Y.; FENG, V.; CHEN, W.; CHANG, H.S.; ZHU, T.; VULPE, C. Expression profiles of *Arabidopsis thaliana* in mineral deficiencies reveal novel transporters involved in metal homeostasis. **Journal Biological Chemistry.** v.278, p.47644-53. 2003.

WISSUWA, M. Combining a modeling with a genetic approach in establishing associations between genetic and physiological effects in relation to phosphorus uptake. **Plant and Soil.** v.269, n.1/2, p.57-68. 2005.

WU, P.; HU, B.; LIAO, C.Y.; ZHU, J.M.; WU, Y.R.; SENADHIRA, D.; PATERSON, A.H. Characterization of tissue tolerance to iron by molecular markers in different lines of rice. **Plant and Soil.** v.203, p.217–226. 1998.

YI, Y.; GUERINOT, M.L. Genetic evidence that induction of root Fe(III) chelate reductase activity is necessary for iron uptake under iron deficiency. **Plant Journal.** v. 0, p.835–844. 1996.

YOKOSHO, K.; YAMAJI, Y.; 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.

YOSHIDA, S. **Fundamentals of rice crop science**. The International Rice Research Institute, Phillippines, 269p. 1981.

YOSHIDA, S.; FORNO, D. A.; COCK, J. H.; GOMEZ, K. A. **Laboratory Manual for Physiological Studies of Rice.** The international rice research institute (IRRI). Los Baños, Laguna, Philippines. 1976.

ZANCANI, M.; PERESSON, C.; BIROCCIO, A.; FEDERICI, G.; URBANI, A.; MURGIA, I.; SOAVE, C. et al. Evidence for the presence of ferritin in plant mitochondria. **Eur J Biochem.** v.271, p.3657–3664. 2004.

ZHANG, X.; ZHANG, F.; MAO, D. Effect of iron plaque outside roots on nutrient uptake by rice (*Oryza sativa* L.): Phosphorus uptake. **Plant Soil.** v.209, p.187-192.1999.

3. CAPÍTULO II

INTERFERÊNCIA DA UTILIZAÇÃO DO AGENTE QUELANTE (EDTA) NA CARACTERIZAÇÃO DE GENÓTIPOS DE ARROZ QUANTO À TOLERÂNCIA AO FERRO EM SOLUÇÃO NUTRITIVA

3.1 INTRODUÇÃO

Em solos inundados, como ocorre no cultivo de arroz irrigado, com a redução do oxigênio, microrganismos anaeróbicos passam a utilizar-se de compostos oxidados do solo. Essas reações de redução modificam o pH e aumentam a disponibilidade de vários elementos (PONNANPERUMA, 1972). Entre estes elementos estão o íon férrico (Fe^{3+}) que normalmente encontra-se quelado à matéria orgânica do solo, sendo este de baixa disponibilidade para as plantas, e o íon ferroso (Fe^{2+}), o qual é mais solúvel e, portanto, mais facilmente absorvido podendo ocasionar problemas de toxidez às espécies cultivadas neste ambiente (BECANA et al., 1998). Embora problemas de toxidez por ferro possam ser evidenciados em uma ampla gama de tipos de solo, as características gerais que estes compartilham na maioria das vezes são: elevados teores de Fe^{2+} , baixo pH e CTC, assim como baixo teor de K trocável (OTTOW et al., 1982). Além disso, podem estar associados a deficiência de P e de Zn e a toxicidade de H_2S (KIRK, 2004).

A toxidez por ferro é um dos mais importantes estresses abióticos a limitar a produção de arroz irrigado em nível mundial (DOBERMANN; FAIRHURST, 2000; WARDA, 2001), podendo levar a perdas consideráveis na produção, que podem alcançar até 100% de redução no rendimento, em níveis elevados de toxidez e de sensibilidade dos cultivares de arroz (BENCKISER et al., 1982; SAHRAWAT; DIATTA, 1996; AUDEBERT; SAHRAWAT, 2004). De acordo com Bacha (1993), nas condições brasileiras as reduções na produtividade podem chegar a 80%. No Rio Grande do Sul segundo o Instituto Rio-Grandense do Arroz, esta proporção pode alcançar a 20% (IRGA, 2004). No entanto, a exploração do potencial genético é uma

alternativa para a produção da cultura em solos com potencial de ocorrência de toxidez por ferro (FAGERIA et al., 2003), sendo, a característica de tolerância sistematicamente avaliada nas constituições genéticas em programas de melhoramento (VAHL, 1991).

Visando evitar os efeitos da toxicidade por ferro em lavouras de arroz irrigado tem sido realizada a seleção de genótipos que apresentem variabilidade para o caráter (MAGALHÃES JR. et al., 2007). Diversos estudos já demonstraram que variedades de arroz diferem amplamente quanto aos níveis de tolerância à toxidez por ferro (GUNAWARDENA et al., 1982; MAHADEVAPPA et al., 1991; SAHRAWAT et al., 1996; WU et al., 1998; BENNETT, 2001; SAHRAWAT, 2004; SHIMIZU et al., 2005; WISSUWA, 2005; MAGALHÃES JR. et al., 2005, 2007; CRESTANI et al., 2009).

A avaliação de plântulas em cultivo hidropônico quanto ao comportamento frente a diferentes estresses abióticos permite maior controle experimental e apresenta algumas vantagens em relação ao método convencional, tais como: obtenção de resultados em curto espaço de tempo, redução de custos operacionais, facilidade de avaliação e maior eficiência (FURLANI et al., 2000). O emprego de solução nutritiva combinada a diferentes concentrações de ferro tem permitido à discriminação de constituições genéticas tolerantes a toxidez pelo metal (CAMARGO; CAMARGO, 1985; CRESTANI et al., 2009).

O Fe^{2+} é a forma química preferencialmente absorvida pelas plantas. Entretanto íons de ferro apresentam a importante capacidade de ser facilmente oxidados passando do estado ferroso (Fe^{2+}) ao estado férrico (Fe^{3+}) precipitando-se em óxidos insolúveis, reduzindo a disponibilidade do nutriente para as plantas. O problema da precipitação é mais severo em ambiente aerado e onde o pH tende a alcalinidade. Sob essas condições o Fe^{2+} é oxidado a Fe^{3+} e conservado na forma insolúvel de $\text{Fe}(\text{OH})_3$ (GEORGE et al., 2008).

A fim de evitar a precipitação do ferro e mantê-lo disponível para ser absorvido pelas plantas, este nutriente é usualmente fornecido ligado a um agente quelante. Os agentes quelantes variam em sua capacidade de ligação ou avides de acordo com sua estrutura química e o seu grau de ionização, o que muda em função do pH da solução. Elevadas concentrações de agentes quelantes, no entanto, apresentam ação fitotóxica. Os agentes quelantes sintéticos apresentam elevada

estabilidade de ligação com íons divalentes e trivalentes. Alguns dos principais estão listados no quadro 1 (abaixo). (GEORGE et al., 2008).

Quadro 1. Alguns dos agentes quelantes mais comumente utilizados.

EDTA	ácido etileno-diamino tetra-acético (Ethylenediaminetetraacetic acid)
EGTA	ácido etileno-glicol-bis tetra-acético (Ethyleneglycol-bis (2-aminoethylether) tetraacetic acid)
EDDHA	ácido etileno-diamino-di (o-hidroxifenil)-acético (Ethylenediamine-di(o-hydroxyphenyl) acetic acid)
DTPA	ácido dietileno-triaminopentacético (Diethylenetriaminepentaacetic acid)
DHPT	ácido diamino-hidroxipropano tetra-acético (1,3-diamino-2-hydroxypropane-tetraacetic acid)

Fonte: Plant Propagation by Tissue Culture, 2008.

A utilização de agentes quelantes sintéticos quelados a micronutrientes tem a função de favorecer o crescimento de plantas que se desenvolvem em condições alcalinas, aumentando a disponibilidade de metais essenciais como ferro e zinco, que nestas condições não se encontram disponíveis. A adição de tais compostos ao meio de cultura pode ajudar a tornar macro e micronutrientes mais acessíveis as plantas (GEORGE et al., 2008).

O sal dissódico usualmente conhecido como EDTA (etileno diamino tetra acetato) é o reagente estabilizante mais amplamente utilizado em soluções, em função de sua propriedade quelante, permitindo a obtenção de soluções mais estáveis (COMETTI et al., 2006). Em trabalhos de cultura de tecidos o EDTA é acrescentado em uma concentração equimolar de ferro, formando um composto Fe-EDTA (etileno diamino tetra acetato de ferro) (DALTON et al., 1983).

Em cultivo hidropônico a vantagem da adição de ferro quelado ao EDTA foi reconhecida pela primeira vez em 1950 (JACOBSON, 1951; WEINSTEIN et al., 1951). Street et al., (1952) evidenciaram que o composto Fe-EDTA, oriundo de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e $\text{Na}_2\text{-EDTA}$, era menos tóxico do que o ferro utilizado na sua forma

livre de sulfato ferroso e podia ser utilizado para cultivo “*in vitro*”. Klein e Manos (1960) demonstraram que calos de várias espécies de plantas cresciam mais rapidamente quando era utilizado $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ quelado com o EDTA. Desta forma, concluíram que o ferro livre na forma de sulfato férrico apresentava-se menos eficaz do que na forma quelada para este determinado fim.

Em 1956 alguns pesquisadores já haviam começado a utilizar o EDTA em meio de cultura em experimentos com tabaco, com meio MS conforme metodologia descrita por Murashige e Skoog (1962). A adição de Fe-EDTA melhorou a disponibilidade do elemento. Após esta publicação os complexos de Fe-EDTA foram reconhecidos como agentes contribuidores no desenvolvimento de diversos tipos de plantas em meio de cultura (NITSCH, 1969), tornando o EDTA um componente padrão utilizado, sendo geralmente preferido como alternativa de agente quelante.

Alguns estudos demonstraram que somente uma pequena parte do Fe^{2+} se mantém quelado ao EDTA, já com o Fe^{3+} o complexo formado é bem mais estável. No entanto o ferro é absorvido pelas plantas na forma de Fe^{2+} . Desta forma, a absorção do Fe^{3+} -EDTA ocorre provavelmente quando essas moléculas chegam a membrana plasmática externa do citoplasma e o Fe^{3+} é reduzido a Fe^{2+} e o agente quelante é liberado (CHANEY et al., 1972; ROMHELD; MARSCHNER, 1983).

Verificou-se na prática que o complexo Fe^{3+} -EDTA apresenta comportamento estável em pH 2-3. No entanto, em níveis mais elevados de pH, este complexo pode se desfazer liberando partículas de ferro. Se isto ocorrer, o EDTA livre tenderá a formar quelatos com outros íons metálicos em solução. Alguns micronutrientes complexados com EDTA podem não estar disponíveis para serem aproveitados pela planta. Re-complexantes também podem ser formados se a proporção de EDTA fornecida for maior que a de Fe, diminuindo a quantidade de Fe adicionado a solução. Em meio de cultura não é possível acrescentar muito mais do que 0,1 mM de EDTA porque o agente quelante tornam-se tóxico para algumas plantas (GEORGE et al., 2008).

Hill-Cottingham e Lloyd-Jones (1961) evidenciaram que o EDTA liberado após a absorção do Fe, formava quelatos com outros metais presentes na solução nutritiva. Teasdale (1987) verificou que quase todos os íons de cobre, zinco, manganês e alguns outros podem ser secundariamente quelados, mas não está claro se os micronutrientes nesta forma se mantêm disponíveis para as plantas,

presumindo, que os sintomas de deficiência não tenham sido relatados em culturas “*in vitro*”.

Em muitos trabalhos iniciais de cultura de tecidos vegetal, os autores não descreveram qual a forma de EDTA utilizada nos experimentos, presumindo-se a utilização na forma de sal dissódico ($\text{Na}_2\text{-EDTA}$). Mais confusão surgiu em trabalhos que utilizaram quelatos de Fe-EDTA sem especificar o peso ou concentração molar de Fe efetivamente utilizada (GEORGE et al., 2008). Singh e Krikorian (1980) já chamavam a atenção para a falta de precisão nestas descrições.

Embora a maior parte de ferro, previamente complexado com agentes quelantes como EDTA, seja absorvido na forma de íon não complexado pelas raízes das plantas, não há evidências de que os próprios agentes quelantes possam ser absorvidos pelos tecidos vegetais (WEINSTEIN et al., 1951; TIFFIN et al., 1960; TIFFIN; BROWN, 1961).

Compostos quelantes como EDTA, em baixa concentração exercem efeitos sobre o crescimento das plantas, que são semelhantes aos produzidos por auxinas. Os efeitos incluem o alongamento do coleótilo em aveia (HEATH; CLARK, 1956), estiolamento de hipocótilo em tremoço (WEINSTEIN et al., 1956) e inibição do crescimento radicular em trigo (BURSTROM, 1961, 1963).

Burstrom (1960) observou que o EDTA inibiu o crescimento radicular na ausência de luz, mas que a inibição do crescimento poderia ser superada pela adição de Fe^{3+} ou vários outros íons metálicos. Em cultura de tecidos, a influência de diferentes agentes quelantes sobre o crescimento e morfogênese tem sido observada. No entanto, ainda não foram esclarecidos se os efeitos observados foram causados pela quelação de íons metálicos, ou pelo agente quelante em si. Apesar de estimular o crescimento das plantas em cultivo hidropônico quando em baixas concentrações, tornando assim o ferro mais facilmente disponível, o EDTA passa a ser tóxico em níveis mais elevados (GEORGE et al., 2008).

Weinstein et al. (1951) sugere que a toxicidade aconteça em virtude da concorrência entre o EDTA e as enzimas (ou outros complexos fisiologicamente ativos), na planta, pelos metais essenciais à sua atividade. Isto ocorre se a avidéz do agente quelante for maior do que a capacidade de ligação do metal às proteínas na superfície das células (ALBERT, 1958). Plantas podem ser danificadas quando cultivadas em meio contendo agentes quelantes sintéticos em pH neutro pois, nestes níveis de pH, EDTA (etileno diamino tetra acetato) e EGTA (etileno glicol tetra

acetato), agentes quelantes que apresentam elevada afinidade com íons de cálcio, removem os íons de cálcio da membrana das mitocôndrias, o que inibe a NAD(P)H, interferindo na oxidação e respiração (MOLLER ; PALMER, 1981).

Agentes quelantes também foram encontrados inibindo a ação de etileno (substância de crescimento), pois promovem o seqüestro de íons de Cu dos tecidos vegetais, interferindo na síntese ou na ação de uma enzima que contém Cu, responsável pelo metabolismo do etileno (GEORGE et al., 2008). O EDTA também inibe a atividade da enzima polifenoloxidase em cultivos “*in vitro*” (WEINSTEIN et al., 1951) e segundo Smith (1968) isso ocorre porque o EDTA reduz a disponibilidade de íons de Cu que seriam incorporados a enzima. Várias reações oxidativas são bioquimicamente catalisadas por íons de Cu^{2+} , Co^{2+} e Zn^{2+} (MARTIN, 1979). De acordo com Kiss e Gergely (1979) o agente quelante EDTA atua como inibidor nas reações de oxidação.

Sorvari e Sillanpää (1996) verificaram que o EDTA complexado a metais como Fe^{3+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} e Hg^{2+} , resultava em uma significativa redução na toxicidade destes metais. Por outro lado, a toxidade do complexo metálico EDTA foi consideravelmente mais elevada quando comparada a toxicidade do EDTA na sua forma livre. Outros estudos a respeito da influência da complexação do EDTA sobre a toxidade do Fe^{3+} , Cd, Cu, Hg, Pb e Zn, demonstraram que a complexação com este agente quelante aumenta a toxicidade do ferro, tem pouca influência sobre a toxidade do Cu, Cd e Hg e reduz sensivelmente a toxicidade do Zn e Pb. O efeito inibitório do EDTA na toxidade de alguns metais é explicado devido a ligação do EDTA nos sítios reativos destes metais, impedindo sua ação normal. Apresenta, portanto, influência sobre a toxidade destes metais, aumentando ou reduzindo. (SILLANPÄÄ; OIKARI, 1996).

Como a presença de agentes quelantes em solução, promovem o seqüestro de alguns íons em maior ou menor quantidade (COMETTI et al., 2006) podendo interferir na disponibilidade dos nutrientes da solução e este estudo teve, como objetivo, avaliar a interferência da utilização do agente quelante (EDTA) na caracterização de genótipos de arroz quanto à tolerância ao ferro em solução nutritiva.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal e condições de cultivo

Genótipos de arroz irrigado (*Oryza sativa* L.), caracterizados em estudos prévios quanto a tolerância ao ferro em condições de campo, foram testados em cultivo hidropônico sob condições de ambiente controlado no Laboratório de Duplo-Haplóides e Hidroponia pertencente ao Centro de Genômica e Fitomelhoramento (CGF) da Faculdade de Agronomia “Eliseu Maciel” (FAEM), Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Capão do Leão – RS, Brasil. No estudo, foram avaliados quatro cultivares de arroz irrigado, que representam constituições genéticas elite pertencentes à coleção de trabalho da Embrapa Clima Temperado. Os genótipos BR-IRGA 414 e Epagri 107 designados como tolerantes e BRS Atalanta e BRS Pelota como sensíveis a toxidez por ferro.

As sementes utilizadas passaram por processo de desinfestação em hipoclorito de sódio 1% durante 10 minutos, após foram lavadas três vezes em água destilada, para posterior acondicionamento em rolos de papel germinador, umedecido com água destilada e posteriormente foram mantidas em câmara de germinação (BOD) a 26°C, com fotoperíodo de 16 horas e umidade relativa de 100% por 72 horas, seguindo os critérios estabelecidos pelas Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 1992). Plântulas uniformes foram transferidas para tela de nylon adaptada à tampa de um recipiente com capacidade para 4 L contendo solução nutritiva de Camargo e Oliveira (1981) modificada, composta por: $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 4 μM ; MgSO_4 2 μM ; KNO_3 4 μM ; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,435 μM ; KH_2PO_4 0,5 μM ; MnSO_4 2 μM ; CuSO_4 0,3 μM ; ZnSO_4 0,8 μM ; NaCl 30 μM ; Fe-EDTA 10 μM ; Na_2MoSO_4 0,10 μM ; H_3BO_3 10 μM em pH 5,0 $\pm$ 0,1. Os recipientes foram acondicionados em um tanque hidropônico, com água a uma temperatura de 25 $\pm$ 1°C, com fotoperíodo de 16 horas e aeração permanente. A solução nutritiva foi trocada a cada sete dias. As plântulas se desenvolveram nessas condições por 14 dias e, subseqüentemente, foram transferidas para os recipientes contendo tratamento controle (T1 = solução nutritiva normal com 0,56 mg L⁻¹ de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ em pH 4,0 $\pm$ 0,1), tratamento Fe sem Na_2EDTA (T2 = 390 mg L⁻¹ de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) e tratamento de Fe com Na_2EDTA (T3 = 390 mg L⁻¹ de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ mais Na_2EDTA em valor equimolar (DALTON et al.,

1983) em pH $4,0 \pm 0,1$) permanecendo nestas condições por sete dias, sem aeração. A solução de tratamento foi trocada a cada três dias. O pH foi aferido diariamente.

Após este período foram avaliadas as seguintes variáveis: comprimento de raiz (CR), em cm; comprimento de parte aérea (CPA), em cm, posteriormente as amostras foram acondicionadas em estufa com circulação a ar a 65°C até atingirem peso constante para subsequente determinação da matéria seca da raiz (MSR) e matéria seca da parte aérea (MSPA). Na seqüência foram determinados o teor de cobre (Cu), zinco (Zn), manganês (Mn) e ferro (Fe) das amostras segundo metodologia descrita por Tedesco et al. (1995).

Delineamento experimental e análise estatística

O estudo foi realizado seguindo o delineamento experimental completamente casualizado, em esquema fatorial tratamento x genótipo (3x4) com três repetições, onde a unidade de observação constituiu-se de 35 plantas por genótipo.

Os dados foram submetidos à análise de variância, comparação de médias pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$) e teste de correlação de Pearson utilizando o nível de significância de $P \leq 0.05$. Todas as análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa computacional SAS (SAS LEARNING EDITION, 2002).

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados apresentados pela análise de variância (Tabela 1) permitem evidenciar variações significativas a 5% de probabilidade de erro pelo teste F para efeito de genótipos e de tratamentos. Entretanto, não foi verificada interação significativa entre os fatores genótipo e tratamento (Gen x Trat) para nenhuma das variáveis, o que determina que a variação causada pelo efeito dos tratamentos sob os genótipos foi de magnitude semelhante. Porém, esta variação deve ser analisada, tendo em vista o efeito significativo para a causa de variação tratamento, para as variáveis MSPA, MSR, CR, Zn e Fe, indicando que estas variáveis são responsivas ao efeito dos diferentes tratamentos, porém com o mesmo comportamento frente aos genótipos analisados. Por outro lado, para a causa de variação genótipo, considerando as variáveis MSPA, MSR, CPA, CR e Cu, foi demonstrando que estas

apresentam comportamento diferenciado nos genótipos avaliados, entretanto, não responderam diferencialmente frente aos tratamentos aplicados.

As variáveis CPA, Cu e Mn, além de não apresentarem interação significativa, também não evidenciaram significância para efeito de tratamento, indicando que estas variáveis não se mostram apropriadas na avaliação dos mesmos (Tabela 1). O fato de não ter sido evidenciada interação significativa para a interação Gen x Trat impossibilita a indicação de uma variável apropriada em discriminar as constituições genéticas frente aos tratamentos empregados. Isso porque uma variável para ser considerada responsiva deve apresentar além de uma apropriada magnitude de variação também efeito significativo para interação (CAMARGO; FERREIRA 1992; FREITAS, 2003).

Na tabela 2, pode ser verificada a resposta das variáveis estudadas em relação aos efeitos dos genótipos avaliados, e também em relação aos tratamentos. Dentre as variáveis (MSPA, MSR, CR, Zn e Fe) que evidenciaram variação significativa para o efeito de tratamento, destaque para MSPA e MSR que apresentaram as médias mais elevadas, para o genótipo tolerante BR-IRGA 414.

As variáveis CR e CPA apresentaram variação apenas no genótipo Epagri 107 que evidenciou as menores médias. Os genótipos BR-IRGA 414 e BRS Atalanta não diferiram em relação a variável Cu. BRS Atalanta também não diferiu dos demais genótipos quanto a esta variável. Já as variáveis teor de Zn, Mn e Fe apresentaram o mesmo comportamento frente aos genótipos avaliados.

Dentre os tratamentos aplicados (Tabela 2), destaque para o T1 (solução normal) no qual foram evidenciadas as maiores médias MSR e CR diferindo das demais, que foram semelhantes. Este resultado demonstra o efeito dos tratamentos com ferro (T2 e T3) sobre o desenvolvimento das raízes das plantas, ocasionando uma redução nas variáveis mensuradas. As variáveis, teor de Zn e Fe, responderam aos tratamentos, sendo verificado um aumento significativo no acúmulo destes nutrientes nas plantas submetidas ao estresse quando comparadas a condição controle. Destaque para a variável teor de Fe, a qual foi capaz de diferenciar os três tratamentos, evidenciando maior acúmulo do íon no tecido das plantas submetidas ao tratamento T2, no qual o ferro foi fornecido na forma livre e não quelado ao EDTA.

Na tabela 3 são apresentadas as concentrações dos micronutrientes (Cu, Zn, Mn e Fe), em mg kg⁻¹, nos quatro genótipos avaliados. Como mencionado no

parágrafo anterior a variável teor de Fe, apresentou comportamento diferenciado frente aos tratamentos aplicados, sendo verificado o menor acúmulo de Fe nas plantas submetidas ao T1 (566 mg kg⁻¹), no T3 (Fe²⁺ c/EDTA) aumentou para 7243 mg kg⁻¹ e no T2 (Fe²⁺ s/EDTA) foi de 11.808 mg kg⁻¹ de Fe. Este comportamento foi evidenciado em todos os genótipos analisados, demonstrando que as plantas acumulam maior quantidade de ferro na forma livre.

O resultado observado com relação ao micronutriente Fe, também sugere que este possa ocorrer em relação aos demais micronutrientes presentes na solução e indispensáveis ao desenvolvimento das plantas, concordando com as considerações de Cometti et al. (2006) de que a presença de agentes quelantes em solução promovem o seqüestro de alguns íons podendo interferir na disponibilidade dos mesmos na solução nutritiva.

Como pode ser verificado na tabela 4, as variáveis que apresentaram maior correlação significativa positiva foram MSPA com MSR (0,88) e CPA (0,86); MSR com CPA (0,77) e CR (0,65); CPA com CR (0,71). A variável teor de Cu apresentou correlação significativa positiva com as variáveis teor de Zn (0,61) e teor de manganês (0,69). Também foi verificada correlação entre a variável teor de Zn com teor de Mn (0,59) e Fe (0,61). Conforme houve um aumento do acúmulo de Fe nos tecidos das plantas também ocorreu um incremento no acúmulo de Zn.

Silveira et al. (2007), verificaram um aumento de duas vezes na concentração de Zn na parte aérea de plantas de arroz sob condições de deficiência de Fe em relação ao tratamento controle, concordando com resultados obtidos por Zang et al. (1998), que evidenciaram melhoria na absorção de Zn na deficiência de Fe, seja através de cátions divalentes ou complexado a fitossideróforos.

Em condições de excesso de ferro como ocorreu neste estudo também foi verificado um aumento no acúmulo de Zn nos tecidos, que pode ser verificado através da análise de correlação, assim como relatado por alguns autores no parágrafo anterior sob condição de deficiência de Fe. Como a maioria dos genes transportadores de Fe²⁺ também são capazes de transportar outros cátions divalentes incluindo Zn²⁺, Mn²⁺ e Cu²⁺ (KORSHUNOVA et al., 1999; ECKHARDT et al., 2001; GROSS et al., 2003; LÓPEZ-MILLÁN et al., 2004; NARAYANAN et al., 2007) é possível que os genes ativados para realizar o transporte de Fe²⁺ também tenham sido responsáveis pelo transporte dos outros metais.

Tabela 1. Resumo da análise da variância, para os caracteres matéria seca da parte aérea (MSPA) e matéria seca de raiz (MSR) em mg; comprimento de parte aérea (CPA) e comprimento de raiz (CR) em cm; teor de cobre (Cu), zinco (Zn), manganês (Mn) e de ferro (Fe) em mg kg⁻¹, de quatro genótipos de arroz irrigado avaliados nos tratamentos normal (T1 = solução nutritiva com 0.56 mg L⁻¹ de FeSO₄.7H₂O), tratamento Fe s/ Na₂EDTA (T2 = 390 mg L⁻¹ de FeSO₄.7H₂O) e tratamento de Fe c/ Na₂EDTA (T3 = 390 mg L⁻¹ de FeSO₄.7H₂O mais Na₂EDTA) em solução hidropônica. FAEM/UFPel-CGF, 2010.

Fonte de variação	GL	QM							
		MSPA	MSR	CPA	CR	Cu	Zn	Mn	Fe
Modelo	11	0,080*	0,003*	14,198*	3,142*	476,52*	3111,92	24554,76	72895613,5*
Genótipo	3	0,234*	0,007*	45,759*	4,634*	1033,04*	1724,86	15240,59	6916896,6
Tratamento	2	0,054*	0,006*	4,784	9,400*	182,37	11119,02*	13114,62	383620248,1*
Gen x Trat	6	0,013	0,000	1,555	0,309	296,32	1136,42	33025,22	2310093,7
Erro	24	0,017	0,000	2,858	0,733	169,38	2370,57	35100,21	3033632,2
Total	35	-	-	-	-	-	-	-	-
Média Geral	-	0,760	0,121	19,136	9,48	44,37	213,79	704,66	6538,82

* Valores significativos a 5% de probabilidade de erro pelo teste F; GL= graus de liberdade; QM= quadrado médio.

Tabela 2. Comparação de médias, para os caracteres matéria seca da parte aérea (MSPA) e matéria seca de raiz (MSR) em mg; comprimento de parte aérea (CPA) e comprimento de raiz (CR) em cm; teor de cobre (Cu), zinco (Zn), manganês (Mn) e de ferro (Fe) em mg kg⁻¹, de quatro genótipos de arroz irrigado avaliados nos tratamentos normal (T1 = solução nutritiva com 0.56 mg L⁻¹ de FeSO₄.7H₂O), tratamento Fe s/ Na₂EDTA (T2 = 390 mg L⁻¹ de FeSO₄.7H₂O) e tratamento de Fe c/ Na₂EDTA (T3 = 390 mg L⁻¹ de FeSO₄.7H₂O mais Na₂EDTA) em solução hidropônica. FAEM/UFPel-CGF, 2010.

Genótipos	MSPA	MSR	CPA	CR	Cu	Zn	Mn	Fe
BR-IRGA 414	0,95 a	0,15 a	20,98 a	9,76 a	58 a	288 a	740 a	7852 a
BRS PELOTA	0,79 ab	0,12 b	20,49 a	9,77 a	35 b	197 a	652 a	6101 a
BRS ATALANTA	0,74 b	0,11 bc	19,08 a	9,95 a	48 ab	207 a	734 a	6142 a
EPAGRI 107	0,56 c	0,09 c	15,97 b	8,40 b	37 b	221 a	691 a	6057 a
Tratamentos	MSPA	MSR	CPA	CR	Cu	Zn	Mn	Fe
T 1	0,82 a	0,14 a	19,74 a	10,49 a	43 a	178 b	742 a	566 c
T 2	0,69 b	0,11 b	18,48 a	9,07 b	41 a	228 a	681 a	11808 a
T 3	0,76 ab	0,10 b	19,17 a	8,86 b	48 a	233 a	690 a	7243 b

* médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade; a, b e c = comparação de médias dos genótipos e dos tratamentos.

Tabela 3. Concentração de micronutrientes na parte aérea dos 4 genótipos de arroz após 7 dias nos tratamentos: Normal (0,56 mg L⁻¹ de Fe²⁺), Fe²⁺ s/EDTA (390 mg L⁻¹ de Fe²⁺) e Fe²⁺ c/EDTA (390 mg L⁻¹ de Fe²⁺ + Na₂EDTA). FAEM/UFPel-CGF, 2010.

Genótipos	Tratamentos	Cu mg kg ⁻¹	Zn mg kg ⁻¹	Mn mg kg ⁻¹	Fe mg kg ⁻¹
Epagri 107	Normal	37	190	792	563
Epagri 107	Fe ²⁺ s/EDTA	34	245	657	10910
Epagri 107	Fe ²⁺ c/EDTA	40	229	625	6699
BR-IRGA 414	Normal	49	176	686	525
BR-IRGA 414	Fe ²⁺ s/EDTA	49	254	696	14186
BR-IRGA 414	Fe ²⁺ c/EDTA	77	256	840	8847
BRS Atalanta	Normal	57	200	859	637
BRS Atalanta	Fe ²⁺ s/EDTA	45	204	623	11449
BRS Atalanta	Fe ²⁺ c/EDTA	41	220	721	6358
BRS Pelota	Normal	30	149	633	554
BRS Pelota	Fe ²⁺ s/EDTA	37	213	757	10686
BRS Pelota	Fe ²⁺ c/EDTA	37	231	577	7064

Cu = cobre, Zn = zinco, Mn = manganês e Fe = ferro

Os resultados indicam que a concentração de Fe²⁺ empregada no experimento não foi restritiva a ponto de diferenciar genótipos tolerantes de sensíveis. No entanto, foi possível evidenciar que no tratamento T2 (Fe s/EDTA), as plantas acumularam mais ferro, demonstrando que estas absorvem maior quantidade do íon na forma livre do que na forma de quelato. E que o aumento do acúmulo de Fe nos tecidos, apresenta correlação significativa positiva com o aumento do acúmulo de Zn encontrado nos mesmos.

Tabela 4. Coeficiente de Correlação de Pearson entre as variáveis: matéria seca da parte aérea (MSPA) e matéria seca de raiz (MSR) em mg; comprimento de parte aérea (CPA) e comprimento de raiz (CR) em cm; teor de cobre (Cu), zinco (Zn), manganês (Mn) e de ferro (Fe) em mg kg⁻¹, de quatro genótipos de arroz irrigado avaliados nos tratamentos normal (T1 = solução nutritiva com 0.56 mg L⁻¹ de FeSO₄.7H₂O), tratamento Fe s/ Na₂EDTA (T2 = 390 mg L⁻¹ de FeSO₄.7H₂O); e tratamento de Fe c/ Na₂EDTA (T3 = 390 mg L⁻¹ de FeSO₄.7H₂O mais Na₂EDTA); em solução hidropônica. FAEM/UFPel-CGF, 2010.

Variáveis	MSPA	MSR	CPA	CR	Cu	Zn	Mn	Fe
MSPA	1	0,88*	0,86*	0,58*	0,33*	-0,24	0,008	-0,22
MSR		1	0,77*	0,65*	0,27	-0,31	0,03	-0,42*
CPA			1	0,71*	0,26	-0,21	0,03	-0,15
CR				1	0,11	-0,40*	0,15	-0,52*
Cu					1	0,61*	0,69*	0,19
Zn						1	0,59*	0,61*
Mn							1	0,06
Fe								1

* Significante ao nível de 0.05 de probabilidade.

3.4 CONCLUSÕES

Os tratamentos aplicados não permitem à discriminação dos genótipos em tolerantes e sensíveis a toxidez por ferro.

A utilização do Fe-EDTA não melhora a absorção de Fe pelas plantas, ao contrário, reduz.

3.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERT, A. Metal-binding agents in chemotherapy: the activation of metals by chelation. In: **The Strategy of Chemotherapy**. Edited by S. T. Cowan and E. Rowatt. London: Cambridge University Press. 1958. p. 112-138.
- AUDEBERT, A., SAHRAWAT, K. L. Mechanisms for iron toxicity tolerance in lowland rice. **J. Plant Nutr.** v. 23, p.1877-1885. 2000.
- BACHA, R. Avaliação de linhagens e cultivares de arroz irrigado para condições adversas de solo: toxidez por ferro. 19, 1993. In: Reunião da Cultura do Arroz Irrigado, Balneário Camburiú. **Anais**. Florianópolis: EMPASC, 1993.p.156-159.
- BECANA M.; MORAN J.F.; ITURBE-ORMAETXE I. Iron-dependent oxygen free radical generation in plants subjected to environmental stress: Toxicity and antioxidant protection. **Plant and Soil**. v.201, p.137-147. 1998.
- BENCKISER, G., OTTOW, J. C. G., SANTIAGO, S., WATANABE, I. Physiochemical characterization of iron-toxic soils in some Asian countries. IRRI research paper series 85. **The International Rice Research Institute**, Los Banos, The Philippines.1982.
- BENNETT, J. Status of breeding for tolerance of abiotic stresses and prospects for use of molecular techniques. TAC Secretariat, **Food and Agriculture Organization-FAO**, Rome. 2001.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e da Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília, DF: SNDA/DNDV/CLAV. 365p, 1992.
- BURSTROM, H. Influence of iron and gibberelic acid on the light sensitivity of roots. **Plant Physiology**. v. 13, p. 597-615. 1960.
- BURSTROM, H. Growth action of EDTA in light and darkness. **Plant Physiology**. v. 14, p. 354-377. 1961.
- BURSTROM, H. Growth regulation by metals and chelates. **Adv. Bot. Res.** v. 1, p. 73-100. 1963.
- CAMARGO, C. E. de O.; CAMARGO, O. B. de A. Estudo comparativo da tolerância à toxicidade de ferro e alumínio em arroz. **Bragantia**. v. 44, n.1, p. 97-114.1985.
- CAMARGO, de O. C. E.; FERREIRA, A. W. P. Tolerância de cultivares de trigo a diferentes níveis de manganês em solução nutritiva. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 27, n. 3, p. 417-422, 1992.

CAMARGO, C. E. O. de; OLIVEIRA, O. F. Tolerância de cultivares de trigo a diferentes níveis de alumínio em solução nutritiva e no solo. **Bragantia**, Campinas, v. 40, n. 3, p. 21-23, 1981.

CHANEY, R.L.; BROWN, J. C.; TIFFIN, L. O. Obligatory reduction of ferric chelates in iron uptake by soybeans. **Plant Physiology**. v. 50, p. 208-213. 1972.

COMETTI, N. N.; FURLANI, P. R.; RUIZ, H. A.; FERNANDES FILHO, E.I. Soluções Nutritivas: formulação e aplicações. In: MANLIO S. F. (ed.). **Nutrição Mineral de Plantas**. Viçosa, MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo. 2006. p. 89-114.

CRESTANI, M.; SOUZA, V. Q.; SILVA, J. A. G.; HARTWIG, I.; LUCHE, H. S. de; SOUSA, R. O de.; CARVALHO, F. F. I. de. Comportamento de genótipos de arroz irrigado submetidos ao estresse por ferro em condições de hidroponia. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**. v. 9, p.85-93, 2009.

DALTON, C. C.; IQBAL, K.; TURNER, D. A. Iron phosphate precipitation in Murashige and Skoog media. **Physiologia Plantarum**, v.57, p.472-476, 1983.

DOBERMANN, A.; FAIRHURST, T. Rice: Nutrient disorders and nutrient management. **The International Rice Research Institute**, Manila, Philippines.2000.

ECKHARDT, U.; MAS MARQUES, A.; BUCKHOUT, T.J. Two-iron regulated cation transporters from tomato complement metal uptake-deficient yeast mutants. **Plant Mol Biol**. v.45, p.437-448. 2001.

FAGERIA N.K.; SLATON N.A.; BALIGAR V.C. Nutrient management for improving lowland rice productivity and sustainability. **Advances in Agronomy**. v.80, p.63–152. 2003.

FREITAS, F. A. **Dissimilaridade genética em arroz (*Oryza sativa* L.) quanto à toxicidade ao alumínio**. Dissertação (Mestrado - Ciência e Tecnologia de Sementes). Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de BRS Pelotas, 69f., 2003.

FURLANI, P. R.; DUARTE, A.P.; PATERNIANI, M. E. A. G. Z. Tolerância ao alumínio em cultivares de milho. In: DUARTE, A. P; PATERNIANI, M. E. A. G. Z (Coords). **Fatores bióticos e abióticos em cultivares de milho e estratificação ambiental: avaliação IAC/CATI/Empresas — 1999-2000**. Instituto Agronômico, Campinas, 2000. p.19-29.

GEORGE, E. F.; HALL, A. M.; DE KLERK, G-J. **Plant Propagation by Tissue Culture**. 3. ed. Netherlands, 2008. 479p.

GROSS, J.; STEIN, R.J.; FETT-NETO, A.G.; FETT, J.P. Iron homeostasis related genes in rice. **Genetics and Molecular Biology**. v.26. n.4, p.477-497. 2003.

GUNAWARDENA, I.; VIRMANI, S. S.; SUMO, F. J. Breeding rice for tolerance to iron toxicity. *Oryza* 19, 5–12. Gupta, A. S., Webb, R. P., Holaday, A. S., Allen, R. D. Overexpression of superoxide dismutase protects plants from oxidative stress. **Plant Physiol.** v.103, p.1067–1073.1982.

HEATH, O. V. S.; CLARK, J. E. Chelating agents as plant growth substances. **Nature.** v.177, p. 1118-1121. 1956

HILL-COTTINGHAM, D. G.; LLOYD-JONES, C. P. Absorption and breakdown of iron ethylenediamine tetraacetic acid by tomato plants. **Nature.** v. 189, p.312. 1961.

INSTITUTO RIO-GRANDENSE DO ARROZ (IRGA). **Arroz irrigado no RS:** área cultivada, produção, nº de engenhos e beneficiamento. Disponível em: <http://www.irga.rs.gov.br>. Acesso em: 2004.

JACOBSON, L. Maintenance of iron supply in nutrient solutions by a single addition of ferric potassium ethylenediamine tetra-acetate. **Plant Physiol.** v.26, p.411-413. 1951.

KIRK, G. J. D. The biogeochemistry of submerged soils. **John Wiley & Sons**, Chichester, UK., p. 291, 2004.

KISS, T.; GERGELY, A. Complexes of 3,4-dihydroxyphenyl derivatives III. Equilibrium study of parent and some mixed ligand complexes of dopamine, Alanine and pyrocatechol with nickel(II), copper(II), and zinc(II) ions. **Inorg. Chim. Acta.** v. 36, p.31-36. 1979.

KLEIN, R. M.; MANOS, G. E. Use of metal chelates for plant tissue cultures. **Annals New York Acad. Sci.** v. 88, p.416-425. 1960.

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

LÓPEZ-MILLÁN, A-F.; ELLIS, D. R.; GRUSAK, N. A. Identification and characterization of several new members of the ZIP family of metal ion transporters in *Medicago truncatula*. **Plant Molecular Biology.** v.54, p.583–596, 2004.

MAGALHÃES JR, A. M de; FAGUNDES, P. R. R; GOMES, A.S; FRANCO, D.F.; SEVERO, A. Seleção de linhagens de arroz irrigado do programa de melhoramento da Embrapa à toxicidade por ferro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ARROZ IRRIGADO, 4; REUNIÃO DA CULTURA DO ARROZ IRRIGADO, 26, 2005, Santa Maria. **Anais.** Santa Maria: UFSM, 2005. p. 204-206.

MAGALHÃES JR, A. M de; FAGUNDES, P. R. R; GOMES, A.S; FRANCO, D.F.; SEVERO, A. Avaliação de linhagens de arroz irrigado à toxicidade por ferro do programa de

melhoramento da Embrapa. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ARROZ IRRIGADO, 5; REUNIÃO DA CULTURA DO ARROZ IRRIGADO, 27, 2007, BRS Pelotas. **Anais**. BRS Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2007. p. 108-111.

MAHADEVAPPA, M.; BULBULE, A. V.; SIDDARAMAPPA, R.; KULKARNI, R. S. Field screening of rice cultivars for growth, yield and nutrient uptake in acidic soil. **Plant Soil Sci.** v.45, p.959-965.1991.

MARTIN, J.C.; KLUG, E.; GÜNZEL, A.R. Centrifugation of stallion semen and its storage in large volumes straws. **J. Reprod. Fertil. Suppl.** v.27, p.47-51, 1979.

MOLLER, I. M, PALMER, J. M. The inhibition of exogenous NAD(P)H oxidation in plant mitochondria by chelators and mersalyl as a function of pH. **Plant Physiol.** v.55, p.413-20. 1981.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Plant Physiol.** v.15, p.473-97. 1962.

NARAYANAN, N. N.; VASCONCELOS, M. W.; GRUSAK, M. A. Expression profiling of *Oryza sativa* metal homeostasis genes in different rice cultivars using a cDNA macroarray. **Plant Physiol Biochem.** v.45, 277-286. 2007.

NITSCH, J. P. Experimental androgenesis in *Nicotiana*. **Phytomorphology.** v.19, p.389-404, 1969.

OTTOW, J. C. G.; BENCKISER, G.; WATANABE, I. Iron toxicity of rice as a multiple nutritional soil stress, in Proc. Int. Symp. On Distribution, Characteristics and Utilization of Problem Soils. **Tropical Agriculture Research Center**, p. 167-179, 1982.

PONNAMPERUMA, F.N. The chemistry of submerged soils. **Advanced Agronomy.** v.24, p.29-96, 1972.

RÖMHMELD, V.; MARSCHNER, H. Mechanism of iron uptake by peanut plants. Fe(III) reduction, chelate splitting and release of phenolics. **Plant Physiol.** v.71, p.949-954. 1983.

SAHRAWAT, K. L. Iron toxicity in wetland rice and the role of other nutrients. **Journal Plant Nutr.** v.27, p.1471-1504, 2004.

SAHRAWAT, K. L.; DIATTA, S. Nutrient management and season affect soil iron toxicity, in West Africa Rice Development Association: **Annual Report 1995**, p.34-35.1996.

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM. **SAS: Statistical Analysis System-Getting Started with the SAS Learning Edition**. Cary, NC: SAS Institute Inc., 2002. 86p.

SHIMIZU, H.; SATO, K.; BERBERICH, T.; MIYAZAKI, A.; OZAKI, R.; IMAI, R.; KUSANO, T. LIP19, a basic region leucine zipper protein, is a Fos-like molecular switch in the cold signaling of rice plants. **Plant Cell Physiol.** v.46, p.1623–1634. 2005.

SILLANPÄÄ, M.; OIKARI, A. Assessing the impact of complexation by EDTA and DTPA on heavy metal toxicity using microtox bioassay. **Chemosphere**, v.32, n.8, p. 1485-1497, 1996.

SILVEIRA, V. C. DA.; OLIVEIRA, A. P. DE.; SPEROTTO, R. A.; LUCIANA S. ESPINDOLA, L. S.; AMARAL, L.; DIAS, J. F.; CUNHA, J. B. DA.; FETT, J. P. Influence of iron on mineral status of two rice (*Oryza sativa* L.) cultivars. **Braz. J. Plant Physiol.** v.19, n.2, p.127-139. 2007.

SINGH. M.; KIRKORIAN. A. D. Chelated Iron in Culture Media. **Ann Bot** .v.46, p. 807-809. 1980.

SMITH, C. L. The action of EDTA on the succinoxidase systems of liver mitochondria from lower vertebrates. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v.25, p.805-820. 1968.

SORVARI, J.; SILLANPÄÄ, M. Influence of metal complex formation on heavy metal and fbee edta and dtpa acute toxicity detebmined by *Daphnia Magna*. **Chemosphere**, v.33, n. 6, p. 1119-1127. 1996.

STREET, H. E.; McGONAGLE, M. P.; MCGREGOR, S. M. Observations on the 'staling' of White's medium by excised tomato roots. II. Iron availability. **Plant Physiol.** v.5, p.248-276. 1952.

TEASDALE, R. D. Micronutients. In: Bonga JM, Durzan DJ (eds) **Cell and tissue culture in forestry**, vol. 1. Martinus Nifhoff, Boston, p. 17-49. 1987.

TEDESCO, M. J.; GIANELLO, C.; BISSANI, C. A.; BOHNEN, H.; VOLKWEISS, S. J. **Análises de solo, planta e outros materiais**. 2. ed. Porto Alegre: Departamento de Solos, Faculdade de Agronomia, UFRGS, 1995. 174p. (Boletim técnico, n.5).

TIFFIN, L. O.; BROWN, J. C. Selective absorption of iron from iron chelates by soybean plants. **Plant Physiol.** v.36, n.5 p.710-714. 1961.

TIFFIN, L. O, BROWN, J. C.; KRAUSS, R. W. Differential absorption of metal chelate components by plant roots. **Plant Physiol.** v.35, n.3, p.362-367. 1960.

VAHL, L. C. **Toxidez de ferro em genótipos de arroz irrigado por alagamento**. Porto Alegre. Tese (Doutorado em Ciência do Solo), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1991.

WARDA. Annual Report 2000. West Africa Rice Development Association, Bouake, Côte d'Ivoire. 2001.

WEINSTEIN, L. R.; MEISS, A. N.; UHLER, R. L.; PURVIS, E. R. Growth- promoting effects of ethylene-diamine tetra-acetic acid. **Nature**. v.178, p.1188. 1956.

WEINSTEIN, L. H.; ROBBINS, W. R.; PERKINS, H. F. Chelating agents and plant nutrition. **Science**. v.120, p.41-54. 1951.

WISSUWA, M. Combining a modeling with a genetic approach in establishing associations between genetic and physiological effects in relation to phosphorus uptake. **Plant and Soil**. v.269, n.1/2, p.57-68. 2005.

WU, P.; HU, B.; LIAO, C.Y.; ZHU, J.M.; WU, Y.R.; SENADHIRA, D.; PATERSON, A.H. Characterization of tissue tolerance to iron by molecular markers in different lines of rice. **Plant and Soil**. v.203, p.217–226. 1998.

ZHANG, X.; ZHANG, F.; MAO, D. Effect of iron plaque outside roots on nutrient uptake by rice (*Oryza sativa* L.): Zinc uptake by Fe-deficient rice. **Plant Soil**. v. 202, p.33-39. 1998.

4. CAPÍTULO III

EFEITO DO TEMPO DE EXPOSIÇÃO A TOXIDEZ POR FERRO SOBRE O CRESCIMENTO DE PLÂNTULAS DE ARROZ EM CULTIVO HIDROPÔNICO

4.1 INTRODUÇÃO

O arroz (*Oryza sativa* L.) desempenha importante papel econômico, social e cultural em nível mundial sendo, atualmente, o segundo cereal mais produzido no mundo (FAO, 2010). O Brasil é 1º país fora da Ásia em produção e consumo de arroz e o Rio Grande do Sul é o principal responsável por esta condição de destaque, sendo o principal produtor de arroz irrigado do País (CONAB, 2010).

A Região Sul do Brasil apresenta uma área de aproximadamente sete milhões de hectares constituída por solos de várzea ou hidromórficos (VALH et al., 2004), cerca de 20% da área total do Estado. Estes solos se caracterizam por drenagem natural deficiente e lençol freático próximo à superfície, devido ao relevo plano e a presença de camadas impermeáveis no subsolo, sendo destinados quase que exclusivamente para o cultivo irrigado (PINTO et al., 1999), sendo este principal e mais produtivo método de cultivo de arroz na região.

O ferro é um dos elementos mais abundantes da crosta terrestre (MURAD; FISCHER, 1988), presente no solo em concentrações que podem variar entre 0,7% a 55% (LINDSAY, 1979) e distribuído de forma uniforme ou concentrado (KAMPF, 1988). Este elemento está presente na solução do solo como Fe^{2+} (ferroso), Fe^{3+} (férico) e complexos orgânicos, podendo ser absorvidos pelas plantas nessas três formas. Como o Fe^{3+} é pouco solúvel, o Fe^{2+} e o ferro em complexos orgânicos solúveis são as principais formas de absorção e transporte na planta (MARSCHNER, 1995). O Fe^{3+} é um composto de baixa solubilidade e encontra-se normalmente precipitado, quelado a matéria orgânica. Desta forma, o principal problema da disponibilidade do ferro não é a abundância, mas a solubilidade dos óxidos de ferro,

que é extremamente baixa em ambientes aeróbicos e de pH alcalino (CHRISTOU, 1994; MARSCHNER, 1995).

O sistema de cultivo irrigado preconiza a inundação do solo. A água funciona como uma barreira para a difusão do oxigênio atmosférico para o solo, tornando o ambiente hipóxico. O oxigênio molecular dissolvido na água é consumido pelos microrganismos aeróbicos, que com o tempo são substituídos pelos anaeróbios, resultando num ambiente de redução e acúmulo de CO_2 . Este acúmulo de CO_2 diminui o pH favorecendo a redução de compostos oxidados (PONNAMPERUMA, 1972). Ocorre, portanto, a solubilização ou redução do Fe^{+3} à Fe^{+2} , liberando o mesmo para a solução do solo aumentando a disponibilidade de ferro (BECANA et al., 1998).

O aumento da concentração de Fe^{2+} na solução do solo pode levar a uma absorção excessiva deste metal, sendo este rapidamente acumulado nas folhas, podendo causar perdas consideráveis na produção de arroz (SAHRAWAT, 2004). A toxidez por ferro é um dos mais importantes fatores abióticos a limitar produção do arroz irrigado (DOBERMANN; FAIRHURST, 2000), e tem sido freqüentemente relatada por afetar esta cultura em diversos locais do mundo (WARDA, 2001; SOUSA et al., 2004). O excesso de ferro leva à potencialização de estresse oxidativo, com aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (FANG et al., 2001; EATON; QIAN, 2002), desencadeando inúmeros sintomas fisiológicos, bioquímicos e morfológicos nas plantas.

No Rio Grande do Sul os teores críticos na solução do solo normalmente variam de 30 mg L^{-1} a concentrações acima de 500 mg L^{-1} (SOUSA et al., 2006). Uma concentração de 300 mg L^{-1} na solução do solo normalmente é considerada crítica, limitando o cultivo de arroz irrigado (LANTIN; NEUE, 1989). Porém dependendo do local e da cultivar utilizada, os níveis críticos podem variar alcançando valores de até 2500 mg L^{-1} , indício de que a toxidez por ferro está relacionada a outros fatores além da concentração de ferro no solo, como por exemplo o pH do solo (TADANO; YOSHIDA, 1978). Sousa et al. (2006), relatam que a presença de elevados teores de ferro no solo não é a única característica determinante para a ocorrência de toxidez. Outros fatores como, pH, teor de matéria orgânica, temperatura, características eletroquímicas de superfície, tempo de alagamento, natureza e grau de cristalinidade dos óxidos de Fe também exercem forte influência sobre a ocorrência e a intensidade do estresse.

A característica de tolerância a toxidez por ferro tem sido sistematicamente avaliada nas constituições genéticas em processo de melhoramento (VAHL, 1991). Segundo Magalhães Jr. (2005), a utilização de cultivares resistentes é uma alternativa eficiente para evitar os efeitos da toxicidade por ferro em lavouras de arroz irrigado, cujos solos apresentam histórico de ocorrência do problema.

A exploração do potencial genético é uma das estratégias mais promissoras a fim de controlar o problema, estudos já demonstraram que variedades de arroz diferem amplamente quanto aos níveis de tolerância à toxidez por ferro e também quanto a outros estresses abióticos, variando em relação à fase fenológica da planta como também em relação aos mecanismos envolvidos (SAHRAWAT, 2004), seja através de métodos de melhoramento convencional (AKBAR et al., 1987; GUNAWARDENA et al., 1982; MAHADEVAPPA et al., 1991; SAHRAWAT et al., 1996; LUO et al., 1997; MAGALHÃES JR. et al., 2005, 2007; CRESTANI et al., 2009) ou através do uso de ferramentas biotecnológicas como análise de QTLs (*Quantitative Trait Loci*), combinado ao uso de marcadores moleculares (WU et al., 1998; BENNETT, 2001; SHIMIZU et al., 2005; WISSUWA, 2005).

As cultivares diferem quanto a sua capacidade de lidar com a variável Fe^{2+} em diferentes situações, fases fenológicas e tipos de mecanismos de tolerância envolvidos neste processo (SAHRAWAT, 2004). Tais mecanismos podem incluir: (I) a exclusão do Fe potencialmente tóxico a partir da raiz ou simplasto da folha; (II) a retenção e imobilização do metal, impedindo sua translocação para a parte aérea das plantas; ou ainda (III) a detoxificação do Fe^{2+} em tecidos vegetais (BECKER; ASCH, 2005).

Dentro de um mesmo cultivar a tolerância ao estresse e os mecanismos envolvidos neste processo podem mudar em função da fase de desenvolvimento da planta, duração e intensidade do estresse e ainda serem afetadas pelas condições ambientais (temperatura e pressão atmosférica). Há, no entanto uma necessidade de seleção específica de genótipos para cada ambiente, na busca por uma solução efetiva para o problema de toxidez por ferro (KATRIN, 2009). Portanto, a eficácia de um determinado mecanismo de tolerância depende da intensidade e da duração do estresse por Fe^{2+} (ASCH et al., 2005). Segundo, Audebert e Fofana (2009), o tempo de duração e a intensidade do estresse por Fe^{2+} estão diretamente correlacionados às condições ambientais e a disponibilidade de Fe^{2+} presente na solução do solo.

Diante destas considerações este estudo teve como objetivo avaliar o efeito do tempo de exposição a um elevado teor de ferro sobre o crescimento de plântulas de arroz em cultivo hidropônico.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal e condições de cultivo

Quatro genótipos de arroz irrigado (*Oryza sativa* L.) foram caracterizados quanto a tolerância a toxidez por ferro em cultivo hidropônico, BRS-Agrisul e Epagri 108 (tolerantes), BR-IRGA 410 (sensível) e Nipponbare, oriundos da coleção de trabalho da Embrapa Clima Temperado, foram avaliados sob condição hidropônica, no Laboratório de Duplo-Haplóides e Hidroponia do Centro de Genômica e Fitomelhoramento (CGF) da Faculdade de Agronomia “Eliseu Maciel” (FAEM), Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Capão do Leão – RS, Brasil.

As sementes utilizadas no experimento passaram por processo de desinfestação em hipoclorito de sódio 1% durante 10 minutos, após foram lavadas três vezes em água, para posterior acondicionamento em rolos de papel germinador, umedecido com água ultrapura. Posteriormente, foram mantidas em câmara de germinação (BOD) a 26°C, com fotoperíodo de 16 horas e umidade relativa de 100% por 72 horas, seguindo os critérios estabelecidos pelas Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 1992).

Plântulas uniformes foram transferidas para tela de nylon adaptada à tampa de um recipiente com capacidade para 4 L, contendo solução nutritiva de Camargo e Oliveira (1981) modificada, composta por: $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 4 μM ; MgSO_4 2 μM ; KNO_3 4 μM ; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,435 μM ; KH_2PO_4 0,5 μM ; MnSO_4 2 μM ; CuSO_4 0,3 μM ; ZnSO_4 0,8 μM ; NaCl 30 μM ; Fe-EDTA 10 μM ; Na_2MoSO_4 0,10 μM ; H_3BO_3 10 μM em pH $4,0 \pm 0,1$.

Os recipientes foram acondicionados em um tanque hidropônico, com água a uma temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, com fotoperíodo de 16 horas e aeração permanente. As plântulas se desenvolveram nessas condições por 14 dias e, subseqüentemente, foram transferidas para os recipientes contendo tratamento controle (T1 = solução nutritiva normal com 0.56 mg L⁻¹ de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ em pH $4,0 \pm 0,1$) ou tratamento de estresse por Fe (T2 = 500 mg L⁻¹ de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ em pH $4,0 \pm 0,1$) permanecendo nestas condições por até 12 dias, sem aeração. E com pH aferido diariamente.

As plântulas foram avaliadas em cinco tempos de exposição ao estresse por ferro (0; 3; 6; 9 e 12 dias), tendo sido avaliadas as seguintes variáveis: comprimento de raiz (CR), e comprimento de parte aérea (CPA), em cm. Pois de acordo com Fageria et al. (1981) estas variáveis permitem a discriminação de genótipos de arroz quanto a tolerância a toxidez por ferro em solução nutritiva. Posteriormente as amostras foram acondicionadas em estufa com circulação a ar a 65°C até atingirem peso constante para subsequente determinação do peso de matéria seca da parte aérea (PMSPA). Na seqüência foi determinado o teor de ferro (Fe) presente nas amostras, segundo metodologia descrita por Tedesco et al. (1995).

Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental adotado foi completamente casualizado, em esquema fatorial tratamento x genótipo x tempo (2x4x5) com três repetições, onde a unidade de observação constituiu-se de 20 plantas por genótipo. Os dados foram submetidos à análise de variância, comparação de médias pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$) e ajuste de regressão polinomial, a fim de explicar o comportamento dos genótipos frente ao aumento do tempo de exposição ao estresse por Fe^{2+} , com base nas variáveis CR, CPA e teor de Fe. Foi realizado teste de significância para as equações do tipo linear ($y = a + bx$) e quadrática ($y = a + bx + cx^2$). As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa computacional SAS (SAS LEARNING EDITION, 2002).

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O resumo da análise de variância apresentado na tabela 1 revela que a interação tripla (tratamento x genótipo x tempo) foi significativa para as variáveis teor de Fe e CPA. Já em relação à variável CR, os genótipos não apresentaram diferença significativa quanto ao tipo de tratamento, apenas quanto ao tempo de exposição aos tratamentos, demonstrando que a dose testada inicialmente não foi restritiva a ponto de diferenciar os genótipos quanto ao CR. No entanto, com o aumento do tempo de exposição aos tratamentos os genótipos passaram a responder diferencialmente, apresentando uma redução significativa no CR daqueles indivíduos submetidos a condição de estresse por excesso de ferro. Os

resultados indicam a presença de variabilidade genética entre os genótipos analisados.

Analisando os fatores de modo exclusivo, é possível verificar que o fator tempo evidenciou forte efeito sobre o comportamento das variáveis analisadas caracterizado pelo elevado valor de quadrado médio. Para as variáveis Fe e CPA este foi o fator de maior significância na diferenciação dos genótipos. Quanto à variável CR o fator de maior relevância foi o tratamento, apresentando um valor de quadrado médio de 63,61, significativamente superior aos demais. Ainda nesta análise é possível constatar que os valores atribuídos ao coeficiente de determinação (R^2) e ao coeficiente de variação (CV) indicam confiabilidade e precisão dos resultados obtidos neste estudo (Tabela 1).

Após estas considerações, a análise prosseguiu de modo a permitir o desdobramento das interações, evidenciadas através da análise de variância. A fim de observar o comportamento de cada genótipo frente aos diferentes tratamentos no decorrer do aumento do tempo de exposição ao efeito tóxico do íon ferroso.

Considerando a variável teor de Fe, podemos constatar que na avaliação de 3 dias sob excesso de ferro os genótipos já apresentaram comportamento diferenciado quanto ao acúmulo do metal na parte aérea das plantas. Aqui podemos verificar que todos os genótipos acumularam elevados níveis de ferro e que inicialmente os genótipos considerados tolerantes Epagri 108 e BRS-Agrisul juntamente com o genótipo sensível BR-IRGA 410 foram os que apresentaram o maior acúmulo do íon nos tecidos (Figura 1).

Na avaliação de 6 dias sob estresse os genótipos sensíveis Nipponbare e BR-IRGA 410 aumentaram a absorção de ferro e se igualaram ao Epagri 108, enquanto que o BRS-Agrisul reduziu sua absorção diferenciando-se dos demais. Quando avaliados aos 9 dias sob estresse por Fe^{2+} , apenas o genótipo tolerante Epagri 108 se diferenciou dos demais apresentando o menor acúmulo de ferro nos tecidos. Já aos 12 dias de estresse todos os genótipos apresentaram comportamento semelhante não diferindo quanto ao teor de ferro acumulado na parte aérea (Figura 1).

Tabela 1. Resumo da análise da variância, para as variáveis: comprimento de parte aérea (CPA) e comprimento de raiz (CR) em cm, e teor de ferro (Fe) em mg kg⁻¹, de quatro genótipos de arroz irrigado avaliados nos tratamentos controle (T1 = solução nutritiva com 0.56 mg L⁻¹ de FeSO₄.7H₂O) e tratamento com Fe (T2 = 500 mg L⁻¹ de FeSO₄.7H₂O) em cinco tempos de avaliação (0; 3; 6, 9 e 12 dias) em solução nutritiva. FAEM/UFPel-CGF, 2010.

Fonte de variação	GL	QM		
		Fe	CPA	CR
Modelo	39	237330*	19,88*	3,60*
Tratamento	1	483894*	89,18*	63,61*
Genótipo	3	516751*	59,24*	1,33*
Trat * Gen	3	458620*	6,09*	0,77
Tempo	4	530040*	86,48*	8,55*
Trat * Tempo	4	526294*	13,05*	5,24*
Gen * Tempo	12	6850*	4,01*	0,94*
Trat * Gen * Tempo	12	6679*	3,67*	0,34
Erro	80	1389	1,84	0,41
Total	119	-	-	-
Média Geral	-	6.516	21,79	9,47
R ²	-	0,98	0,83	0,80
CV%	-	18,09	6,23	6,81

* Valores significativos a 5% de probabilidade de erro pelo teste; GL= graus de liberdade; QM= quadrado médio, CV= coeficiente de variação e R² = coeficiente de determinação.

Neste estudo, foi constatado que tanto os genótipos tolerantes quanto sensíveis acumularam elevados teores de ferro na parte aérea. Silveira et al. (2007) e Stein et al. (2009) também observaram resultados semelhantes, plantas sensíveis e tolerantes, acumularam elevados níveis de ferro tanto em tecidos radiculares quanto na parte aérea. No entanto o teor de Fe encontrado no genótipo sensível foi ainda mais elevado do que o observado no genótipo tolerante. Ahlert (2010), analisando dois genótipos de arroz irrigado BR-IRGA 410 (sensível) e Epagri 107 (tolerante), sob condição de estresse por ferro, verificou que ambos os genótipos apresentaram elevados teores de Fe na parte aérea e na raiz. No entanto nas análises de raiz foi verificado que o acúmulo de Fe foi bem maior no genótipo sensível.

Foi verificado que o teor de Fe na parte aérea aumentou proporcionalmente ao aumento do tempo de exposição a condição de estresse, sendo este fato de maior proporção nos genótipos sensíveis, pois estes, inicialmente acumulavam proporções de Fe semelhantes aos genótipos tolerantes, mas com o aumento do tempo de estresse, o acúmulo de Fe nos genótipos sensíveis também foi aumentado como demonstrado na figura 1.

Na figura 2 pode ser verificado que os genótipos apresentaram variações significativas no CPA em virtude do aumento do tempo de exposição ao estresse por Fe. Pode ser constatado que de modo geral os genótipos apresentaram redução do CPA sob efeito do tratamento com Fe^{2+} , apresentando comportamento semelhante, tanto genótipos sensíveis quanto tolerantes. Com destaque para o Epagri 108, que demonstrou ser menos afetado pelo efeito do tratamento, em relação aos demais.

Na avaliação de 6 dias sob tratamento os genótipos não diferiram quanto ao CR. Mas a partir deste período foi possível observar um comportamento diferenciado de genótipos tolerantes e sensíveis. Na análise de 9 dias os genótipos Epagri 108 (tolerante) assim como o Nipponbare apresentaram as maiores médias de CR diferenciando estes dos demais que não diferiram entre si. Já na análise de 12 dias, Epagri 108 e BRS-Agrisul (tolerantes), obtiveram os mais elevados valores de CR, diferindo dos genótipos Nipponbare e BR-IRGA 410 (sensível). O efeito do tratamento com Fe^{2+} sobre o CR dos genótipos Epagri 108 e BRS-Agrisul (tolerantes) foi menor do que o observado nos genótipos Nipponbare e BR-IRGA 410 (sensíveis). No entanto, tanto genótipos tolerantes quanto sensíveis apresentaram redução no CR quando expostos ao efeito tóxico do ferro (figura 3).

No decorrer das avaliações mais precisamente nas análises realizadas em 6, 9 e 12 dias sob o tratamento com ferro, foi possível verificar a ocorrência de deposição de partículas de ferro sob a raiz das plântulas submetidas a condição de excesso do íon metálico. Segundo Vahl (2004), este acontecimento caracteriza-se como um mecanismo de adaptação de plantas de arroz a condição de estresse por Fe, através do processo de exclusão do íon ferroso, que fica depositado sob os tecidos radiculares não sendo absorvido excessivamente pelas plantas.

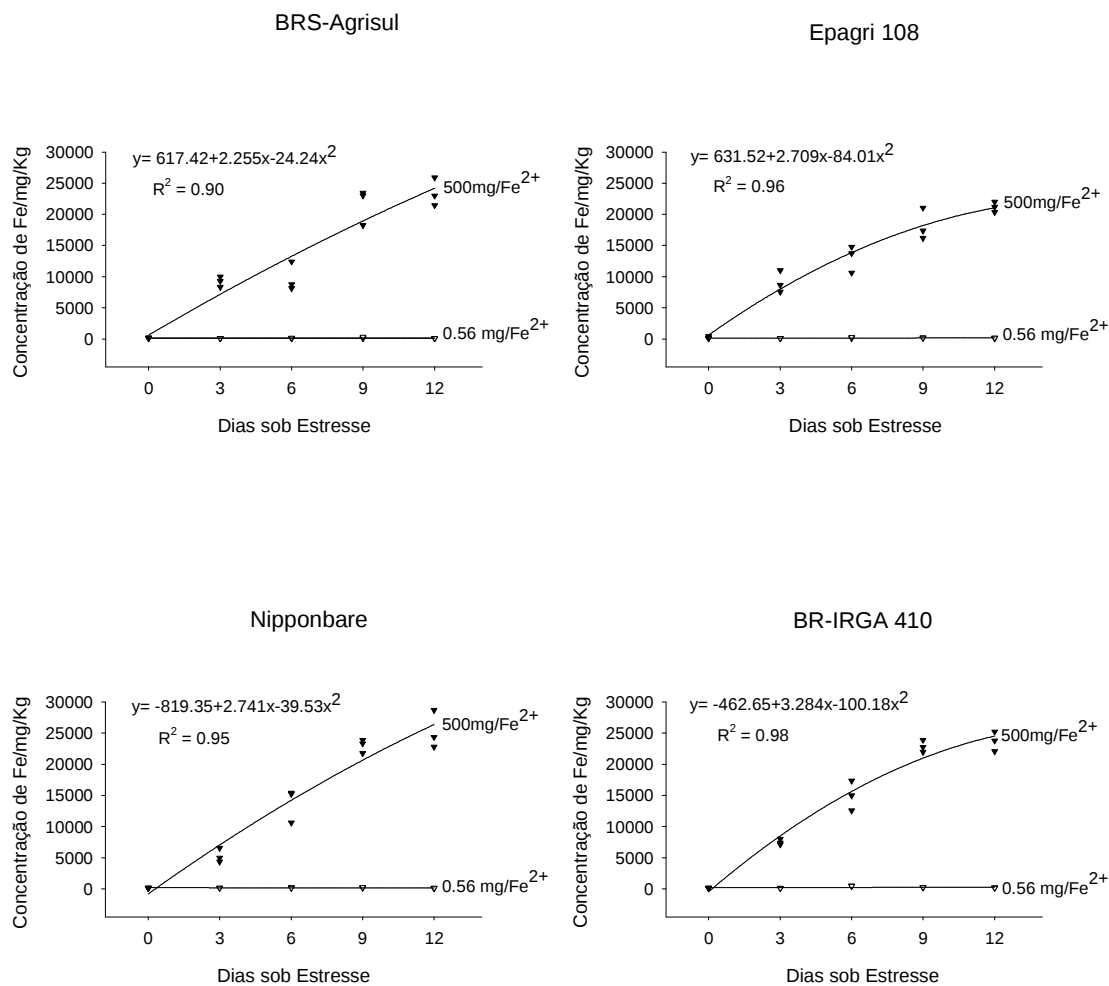


Figura 1. Regressões ajustadas para a variável dependente teor de ferro (Fe) dos genótipos de arroz irrigado BRS-Agrisul, Epagri 108, Nipponbare e BR-IRGA 410, avaliados nos tratamentos controle (0.56 mg L⁻¹ de FeSO₄.7H₂O) e tratamento com Fe (500 mg L⁻¹ de FeSO₄.7H₂O) em cinco tempos sob estresse (0; 3; 6; 9 e 12 dias) em solução nutritiva. FAEM/UFPel-CGF, 2010.

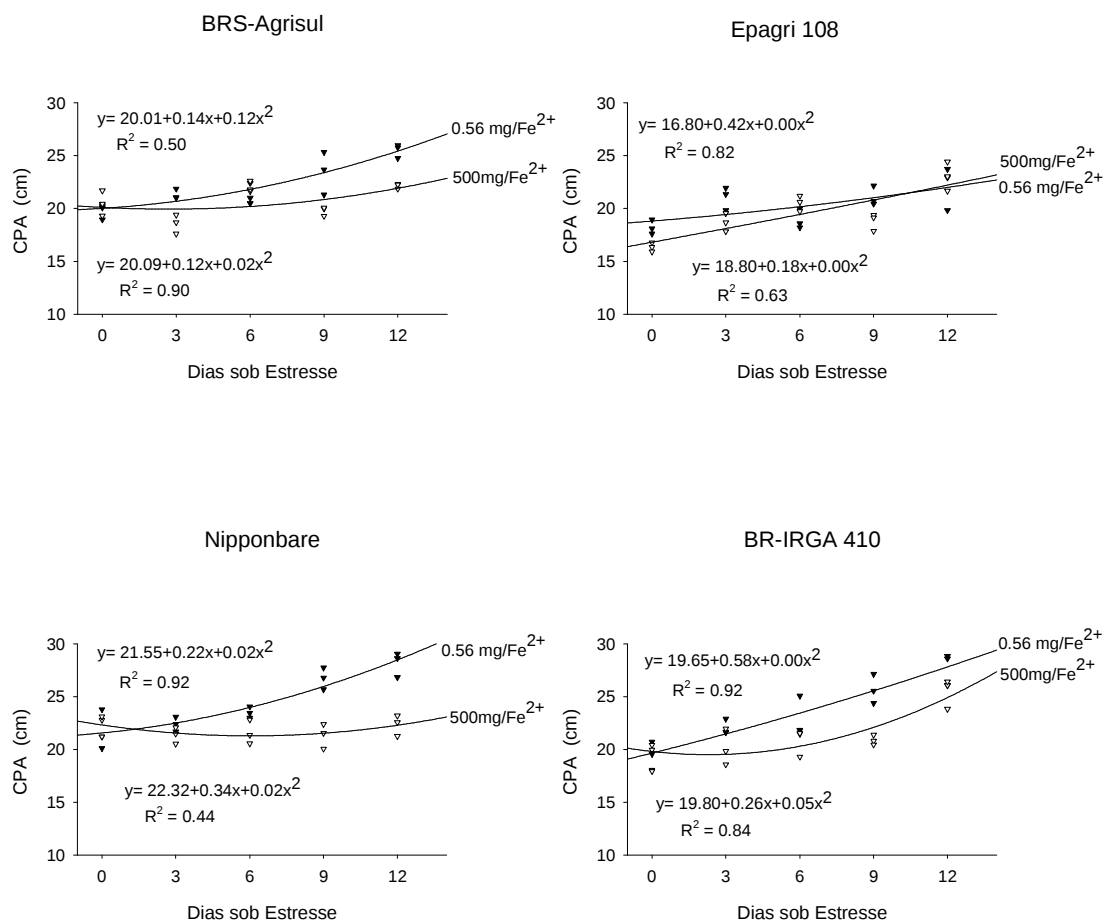


Figura 2. Regressões ajustadas para a variável dependente comprimento de parte aérea (CPA) dos genótipos de arroz irrigado BRS-Agrisul, Epagri 108, Nipponbare e BR-IRGA 410, avaliados nos tratamentos controle (0.56 mg L⁻¹ de FeSO₄.7H₂O) e tratamento com Fe (500 mg L⁻¹ de FeSO₄.7H₂O) em cinco tempos sob estresse (0; 3; 6, 9 e 12 dias) em solução nutritiva. FAEM/UFPel-CGF, 2010.

Sousa et al. (2006) verificaram que os principais sintomas de toxidez por ferro em arroz são inicialmente evidenciados nas raízes das plantas que tendem a paralisar seu crescimento e aumentar a espessura (engrossamento), podendo estes sintomas se manifestar em variados estádios de desenvolvimento da planta. Nos estágios iniciais de desenvolvimento as plantas sofrem severo retardo no crescimento e afilham pouco. Já em estágios mais avançados, o crescimento vegetativo não é muito afetado, mas o rendimento de grãos é reduzido devido à produção de panículas menores e alta proporção de espiguetas estéreis (YOSHIDA, 1981; LANTIN; NEUE, 1988).

Neste estudo pode-se verificar que a condição de toxidez por excesso de ferro provocou redução no CR e este processo foi agravado com o decorrer do tempo de exposição a esta condição (Figura 3).

De modo geral a variável teor de Fe apresentou aumento em função do aumento do tempo de exposição. A variável CPA apresentou diminuição conforme houve um aumento do tempo de tratamento, com exceção da análise de 6 dias onde não foi detectada diferença entre controle e tratado. Já a variável CR apresentou redução significativa, em função do aumento do tempo de estresse.

O nível de correlação entre as variáveis analisadas pode ser evidenciado na tabela 3, na qual pode ser verificado que o incremento da variável teor de Fe acarreta em uma redução significativa de -0,40 no CR e de -0,04 não significativa no CPA. Indicando que o efeito da toxidez por excesso de ferro acumulado nos tecidos das plantas interferiu negativamente sobre o desenvolvimento do CR e CPA, sendo o CR a variável mais afetada.

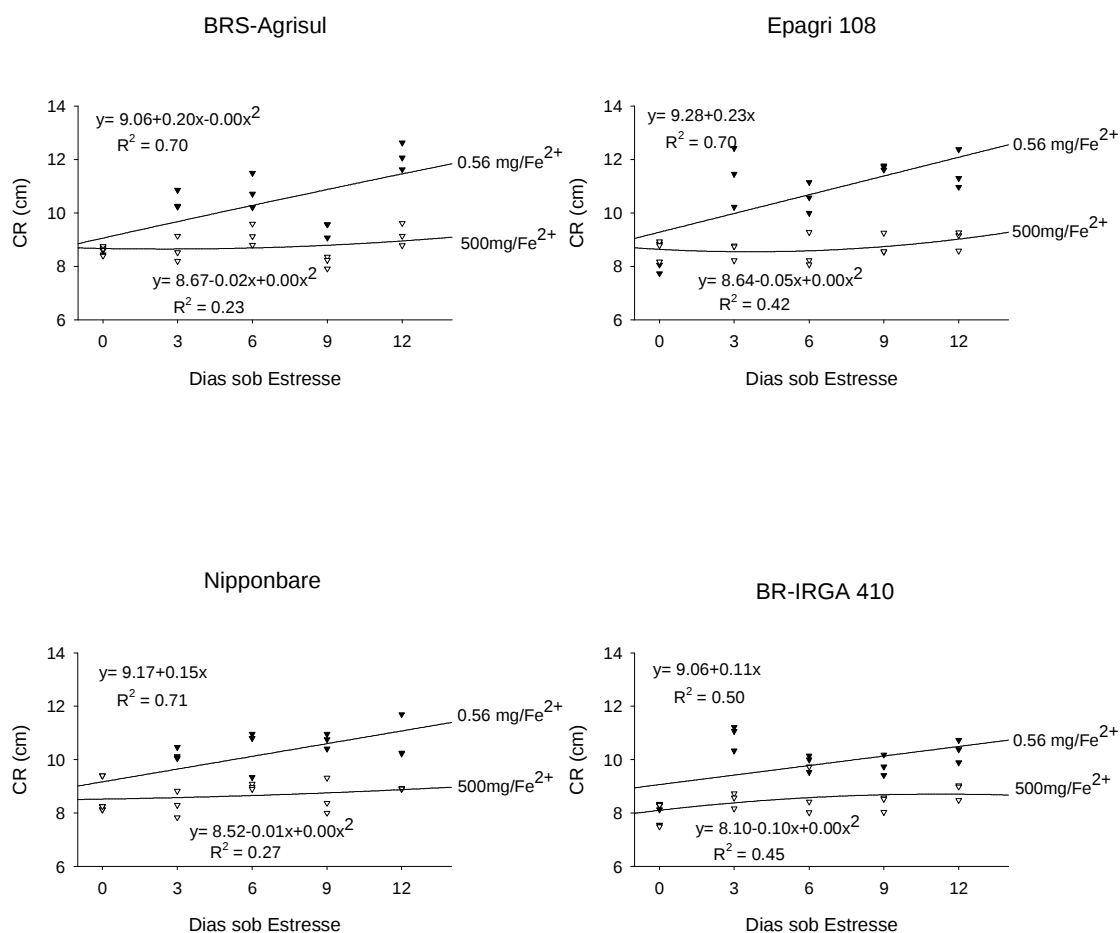


Figura 3. Regressões ajustadas para a variável dependente comprimento de raiz (CR) dos genótipos de arroz irrigado BRS-Agrisul, Epagri 108, Nipponbare e BR-IRGA 410, avaliados nos tratamentos controle (0.56 mg L^{-1} de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) e tratamento com Fe (500 mg L^{-1} de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) em cinco tempos sob estresse (0; 3; 6, 9 e 12 dias) em solução nutritiva. FAEM/UFPel-CGF, 2010.

Tabela 3 Coeficiente de Correlação de Pearson entre as variáveis: comprimento de parte aérea (CPA), comprimento de raiz (CR) e teor de ferro (Fe), de quatro genótipos de arroz irrigado avaliados nos tratamentos: controle (T1 = solução nutritiva com 0.56 mg L^{-1} de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) e tratamento com Fe (T2 = 500 mg L^{-1} de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) em cinco tempos (0; 3; 6, 9 e 12 dias) sob condição hidropônica. FAEM/UFPel-CGF, 2010.

Variáveis	Fe	CPA	CR
Fe	1	- 0.04	- 0.40*
CPA		1	0.43*
CR			1

* Significante ao nível de 0.05 de probabilidade.

4.4 CONCLUSÕES

O fator tempo de exposição a toxidez por ferro evidencia efeito significativo sobre o crescimento de plântulas de arroz em cultivo hidropônico de maneira diferencial para os genótipos testados.

A toxidez por excesso de ferro interfere negativamente sobre o desenvolvimento do CR e CPA, sendo o CR a variável mais afetada.

O aumento do tempo de estresse resulta no incremento do acúmulo de ferro na parte aérea das plântulas.

Tanto genótipos tolerantes quanto sensíveis acumulam elevados teores de Fe na parte aérea.

4.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHLERT, R. J. **Análise proteômica diferencial em raízes de plântulas de arroz (*Oryza sativa* L.) submetidas ao estresse por ferro.** Dissertação de mestrado (Mestrado em ciências) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2010.
- AKBAR, M.; GUNAWARDENA, I.; PONNAMPERUMA, N. Breeding for soil stresses: **Progress in rainfed lowland rice.** IRRI, Los Banos, The Philippines. p.263–272.1987.
- ASCH, F.; BECKER, M.; KPONGOR, D. S. A quick and efficient screen for resistance to iron toxicity in lowland rice, **J. Plant Nutr.Soil Sci.** v.168, n.6, p.764-773, 2005.
- AUDEBERT, A.; FOFANA, M. Rice Yield Gap due to Iron Toxicity in West Africa, **J. Agron. Crop Sci.** v.195, n.1, p.66-76, 2009.
- BECANA M.; MORAN J.F.; ITURBE-ORMAETXE I. Iron-dependent oxygen free radical generation in plants subjected to environmental stress: Toxicity and antioxidant protection. **Plant and Soil.** v.201, p.137-147. 1998.
- BECKER, M.; ASCH, F. Iron toxicity in rice-conditions and management concepts, **J. Plant Nutr. Soil Sci.** v.168, n.4, p.558-573. 2005.
- BENNETT, J. Status of breeding for tolerance of abiotic stresses and prospects for use of molecular techniques. TAC Secretariat, **Food and Agriculture Organization-FAO**, Rome. 2001.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e da Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes.** Brasília, DF: SNDA/DNDV/CLAV. 365p, 1992.
- CAMARGO, C. E. O. de; OLIVEIRA, O. F. Tolerância de cultivares de trigo a diferentes níveis de alumínio em solução nutritiva e no solo. **Bragantia**, Campinas, v. 40, n. 3, p. 21-23, 1981.
- CHRISTOU, P. Rice Biotechnology and Genetic Engineering. **Technomic Publication:** Basel, Switzerland. 1994.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento de safra brasileira: grãos, sexto levantamento, publicação mensal (março), Brasília. 42 p. 2010.
- CRESTANI, M.; SOUZA, V. Q.; SILVA, J. A. G.; HARTWIG, I.; LUCHE, H. S. de; SOUSA, R. O de.; CARVALHO, F. F. I. de. Comportamento de genótipos de arroz irrigado submetidos

ao estresse por ferro em condições de hidroponia. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**. v. 9, p.85-93, 2009.

DOBERMANN, A.; FAIRHURST, T. Rice: Nutrient disorders and nutrient management. **The International Rice Research Institute**, Manila, Philippines.2000.

EATON, J.W.; QIAN, M. Molecular bases of cellular iron toxicity. **Free Radical Biology & Medicine**. v.32, p.833-840. 2002.

FAGERIA, N. K.; BARBOSA FILHO, M. P.; CARVALHO, J. R. P. Influência de ferro no crescimento e na absorção de P, K, Ca e Mg pela planta de arroz em solução nutritiva. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 16, p.483-488, 1981.

FANG, W.C.; WANG, J.W.; LIN, C.C.; KAO, C.H. Iron induction of lipid peroxidation and effects on antioxidative enzyme activities in rice leaves. **Plant Growth Regulation**. v. 35, p.75-80. 2001.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations Statistical Database, disponível em <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx>, acessado em 20 de março de 2010.

GUNAWARDENA, I.; VIRMANI, S. S.; SUMO, F. J. Breeding rice for tolerance to iron toxicity. *Oryza* 19, 5–12. Gupta, A. S., Webb, R. P., Holaday, A. S., Allen, R. D. Overexpression of superoxide dismutase protects plants from oxidative stress. **Plant Physiol**. v.103, p.1067–1073.1982.

KÄMPF, N. O ferro no solo. In: REUNIÃO SOBRE FERRO EM SOLOS INUNDADOS, 1., Goiânia 1988. **Anais...** Goiânia, CNAF/Embrapa, p. 35-71. 1988.

KATRIN, E. Efficiency of adaptation mechanisms of Rice to diverse conditions of iron toxicity. **The Proceedings of the International Plant Nutrition Colloquium XVI**. (University of California, Davis). Paper 1372. 2009.

LANTIN, R. S.; NEUE, H. U. Iron toxicity: a nutritional disorder in wetland rice. 17th Irrigated Rice Meeting. Brazil. 26–30 Sep.1989. **Lavoura-Arrozeira**. v.42, p.3–8.1989.

LANTIN, R.S.; NEUE, H.V. **Iron toxicity: a nutritional disorder in wetland rice**. In: REUNIÃO DA CULTURA DO ARROZ IRRIGADO, 18, Pelotas, 1988. Anais. Pelotas: 1988. 16p. Palestra apresentada.

LINDSAY, W. L. **Chemical equilibria in soils**. New York. John Wiley, p.449. 1979.

LUO, A.; JING, G.; WU, P.; NI, J.; JIANG, S.; ZHANG, Y. Rice genotype differences in nutrient status under excessive ferric iron conditions. **J. Plant Nutr**. v.20, p.1361-1373.1997.

MAGALHÃES JR, A. M de; FAGUNDES, P. R. R; GOMES, A.S; FRANCO, D.F.; SEVERO, A. Avaliação de linhagens de arroz irrigado à toxicidade por ferro do programa de melhoramento da Embrapa. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ARROZ IRRIGADO, 5 ; REUNIÃO DA CULTURA DO ARROZ IRRIGADO, 27, 2007, Pelotas. **Anais**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2007. p. 108-111.

MAGALHÃES JR, A. M de; FAGUNDES, P. R. R; GOMES, A.S; FRANCO, D.F.; SEVERO, A. Seleção de linhagens de arroz irrigado do programa de melhoramento da Embrapa á toxicidade por ferro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ARROZ IRRIGADO, 4 ; REUNIÃO DA CULTURA DO ARROZ IRRIGADO, 26, 2005, Santa Maria. **Anais**. Santa Maria: UFSM, 2005. p. 204-206.

MAHADEVAPPA, M.; BULBULE, A. V.; SIDDARAMAPPA, R.; KULKARNI, R. S. Field screening of rice cultivars for growth, yield and nutrient uptake in acidic soil. **Plant Soil Sci.** v.45, p.959–965.1991.

MARSCHNER. H. Mineral nutrition of higher plants. **Academic Press**, San Diego, USA. 1995.

MURAD, E.; FISCHER, W.R. The geobiochemical cycle of iron. In: Stucki, J.W., Goodman, B.A., Schwertmann, U. (Eds.), **Iron in Soils and Clay Minerals**. D. Reidel Publishing Company, p. 1– 18. 1988.

PINTO, L. F. S.; PAULETO, E. A.; GOMES, A. da S.; SOUZA, R. O. **Caracterização de solos de várzea**. In: Gomes, A.S.; Pauletto, E.A. (Eds). Manejo do solo e da água em áreas de várzea. Pelotas: EMBRAPA CLIMA TEMPERADO, 1999. Cap.1, p.11-36.

PONNAMPERUMA, F.N. The chemistry of submerged soils. **Advanced Agronomy**. v.24, p.29-96, 1972.

SAHRAWAT, K. L. Iron toxicity in wetland rice and the role of other nutrients. **Journal Plant Nutr.** v..27, p.1471-1504, 2004.

SAHRAWAT, K. L.; DIATTA, S. Nutrient management and season affect soil iron toxicity, in West Africa Rice Development Association: **Annual Report 1995**, p. 34–35.1996.

SHIMIZU, H.; SATO, K.; BERBERICH, T.; MIYAZAKI, A.; OZAKI, R.; IMAI, R.; KUSANO, T. LIP19, a basic region leucine zipper protein, is a Fos-like molecular switch in the cold signaling of rice plants. **Plant Cell Physiol.** v.46, p.1623–1634. 2005.

SILVEIRA, V. C.; OLIVEIRA, A. P.; SPEROTTO, R. A.; ESPINDOLA, L. S.; AMARAL, L.; DIAS, J. F.; CUNHA, J. B.; FETT, J. P. Influence of iron on mineral status of two rice (*Oryza sativa* L.) cultivars. **Brazilian Journal of Plant Physiology**. v.19, p.127-139. 2007.

SOUSA, R. O. de.; GOMES, A. da S.; VAHL, L. C. Toxidez por ferro em arroz irrigado. In: GOMES, A da S. e MAGALHÃES JÚNIOR, A. M. de (eds.). **A cultura do arroz irrigado no Sul do Brasil**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2004. pág. 305-334.

SOUSA, R. O. de; CAMARGO, F. A. O.; VAHL, L. C. Solos alagados – Reações de Redox. In: MEURER, E.J. (3 ed.). **Fundamentos de química do solo**. Editora Evangraf, Porto Alegre, p.185-211. 2006.

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM. **SAS: Statistical Analysis System-Getting Started with the SAS Learning Edition**. Cary, NC: SAS Institute Inc., 2002. 86p.

STEIN, R. J. DUARTE, G. L.; SPOHR, M.G.; LOPES, S. I. G.; FETT, J. P. Distinct physiological responses of two rice cultivars subjected to iron toxicity under field conditions. **Annals of Applied Biology**. v.154, p.269-277.2009.

TADANO, T.; YOSHIDA, S. Chemical changes in submerged soils and their effect on rice growth, in IRRI: Soils and Rice. **The International Rice Research Institute**, Manila, The Philippines, p. 399–420. 1978.

TEDESCO, M. J.; GIANELLO, C.; BISSANI, C. A.; BOHNEN, H.; VOLKWEISS, S. J. **Análises de solo, planta e outros materiais**. 2. ed. Porto Alegre: Departamento de Solos, Faculdade de Agronomia, UFRGS, 1995. 174p. (Boletim técnico, n.5).

VAHL, L. C. Nutrição de plantas de arroz irrigado. In: PESKE, S.T.; SCHUCH, L. O. B.; BARROS, A. C. S. A (3ed.) **Produção de arroz irrigado**. Editora Universitária da UFPel, Pelotas, p.153-203. 2004.

VAHL, L.C. **Toxidez de ferro em genótipos de arroz irrigado por alagamento**. Porto Alegre. Tese (Doutorado em Ciência do Solo), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1991.

WARDA. Annual Report 2000. West Africa Rice Development Association, Bouake, Côte d'Ivoire. 2001.

WISSUWA, M. Combining a modeling with a genetic approach in establishing associations between genetic and physiological effects in relation to phosphorus uptake. **Plant and Soil**. v.269, n.1/2, p.57-68. 2005.

WU, P.; HU, B.; LIAO, C.Y.; ZHU, J.M.; WU, Y.R.; SENADHIRA, D.; PATERSON, A.H. Characterization of tissue tolerance to iron by molecular markers in different lines of rice. **Plant and Soil**. v.203, p.217–226. 1998.

YOSHIDA, S. **Fundamentals of rice crop science**. The International Rice Research Institute, Philippines, 269p. 1981.

5. CAPÍTULO IV

CARACTERIZAÇÃO DE GENÓTIPOS DE ARROZ IRRIGADO QUANTO A TOLERÂNCIA AO ESTRESSE POR EXCESSO DE FERRO EM CONDIÇÕES HIDROPÔNICAS

5.1 INTRODUÇÃO

O sistema de cultivo irrigado é o principal e mais produtivo método de cultivo de arroz na região Sul do Brasil, principal região produtora de arroz irrigado do País (CONAB, 2010).

No sistema irrigado os solos são alagados e o oxigênio presente é rapidamente esgotado pela respiração dos microrganismos e raízes das plantas. Logo após a inundação, neste ambiente hipóxico, ocorre a redução de óxidos e hidróxidos de ferro resultando no acúmulo de elevadas concentrações de ferro reduzido (Fe^{2+}) na solução do solo, que podem ocasionar problemas de toxidez para as plantas cultivadas neste ambiente (RATERING; SCHNELL, 2000). No entanto este processo pode ser acentuado em função de algumas características inerentes dos solos como textura leve, elevado teor de acidez e baixa fertilidade (BENCKISER et al., 1982; PRADE et al., 1993)

Sousa et al. (2006) também relataram que a presença de elevados teores de ferro no solo não é a única característica determinante para a ocorrência de toxidez, outros fatores como, pH, teor de matéria orgânica, temperatura, características eletroquímicas de superfície, tempo de alagamento, natureza e grau de cristalinidade dos óxidos de Fe, também exercem forte influência sobre a ocorrência e a intensidade do estresse.

No Rio Grande do Sul os teores críticos na solução do solo normalmente variam de 30 mg L⁻¹ a concentrações acima de 500 mg L⁻¹ (SOUSA et al., 2006). Uma concentração de 300 mg L⁻¹ na solução do solo normalmente é considerada

crítica, limitando o cultivo de arroz irrigado (LANTIN; NEUE, 1989). Porém, dependendo do local e da cultivar utilizada, os níveis críticos podem variar entre 20 e 2500 mg L⁻¹, indício de que a toxidez por ferro está relacionada a outros fatores além da concentração de ferro no solo, como por exemplo o pH do solo (TADANO; YOSHIDA, 1978).

A absorção excessiva de ferro pelas plantas leva à potencialização de estresse oxidativo, aumentando a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (FANG et al., 2001; EATON; QIAN, 2002) e desencadeando inúmeros sintomas fisiológicos, bioquímicos e morfológicos nas plantas. As desordens nutricionais associadas à toxidez por ferro são classificadas em toxidez direta e indireta (VAHL, 1991).

A toxidez direta ocorre em virtude da absorção excessiva de ferro e posterior acúmulo nos tecidos, e caracterizada pela presença de pontuações castanho-escuras sobre a superfície das folhas (bronzamento) ocasionadas pela morte das células nos locais onde o ferro está depositado, além de retardo no crescimento e conseqüente redução de produtividade, podendo em casos extremos acarretar na morte da planta (PONNAMPERUMA et al. 1972; VAHL, 1991). Já a toxidez indireta é caracterizada pela pelo acúmulo de óxido de ferro sobre a superfície das raízes (capa ferrica), acarretando na redução de absorção, transporte e/ou utilização de outros nutrientes pelas plantas como P, K, Ca, Mg e Zn. As folhas desenvolvem uma coloração amarelada (amarelecimento) que evolui do ápice para a base (VAHL, 1991; MEURER, 2000; SAHRAWAT, 2004). A toxidez indireta pode ocorrer em níveis mais baixos de ferro na solução do solo do que a toxidez verdadeira (SAHRAWAT, 2004).

Segundo Becker e Asch (2005), existem três tipos principais de estratégias de controle desencadeadas pela própria planta em resposta ao estresse por ferro que são: (i) exclusão - que ocorre através da oxidação do Fe²⁺ em Fe³⁺, na qual as raízes liberam oxigênio a fim de reoxidar o Fe²⁺, reduzindo a disponibilidade de ferro para as plantas; (ii) inclusão/anulação - o Fe²⁺ é absorvido pelas raízes, no entanto, os danos que poderiam ser causados aos tecidos são evitados através da imobilização ou remobilização do ferro ativo em locais denominados de "aterros", por exemplo, folhas velhas ou folhas fotossinteticamente menos ativas; (iii) inclusão/tolerância - as plantas toleram elevados teores de Fe²⁺ provavelmente via "desintoxicação" enzimática no simplasto.

As plantas são capazes limitar os danos causados pelo excesso do íon metálico, quando este já foi absorvido, através do armazenamento em complexos denominados de fitoferritinas (TAIZ; ZEIGER, 2004), que são proteínas presentes em todos os organismos vivos, e tem a função de armazenar o ferro que é absorvido pelas células, mas que não é utilizado nos processos metabólicos (LOBRÉAUX et al., 1992; BRIAT; LOBRÉAUX, 1997), desempenhando importante função de proteção das células contra o excesso de ferro.

Algumas técnicas de manejo como: calagem, atraso do início do alagamento, drenagem, e aumento e/ou antecipação da adubação fosfatada e potássica, também podem ser adotadas a fim de minimizar os problemas de toxidez (SOSBAI, 2007). Sahrawat et al. 2004, evidenciaram que o suprimento de potássio (K) aumenta o potencial redox das raízes (Fe^{2+} em Fe^{3+}) além de estar envolvido tanto na exclusão de ferro quanto na translocação para as folhas (HOWELER, 1973; TADANO, 1975).

A toxidez por ferro é um dos mais importantes estresses abióticos a limitar produção do arroz irrigado no mundo (DOBERMANN; FAIRHURST, 2000). De acordo com Bacha (1993), nas condições brasileiras as reduções na produtividade podem chegar a 80%. No Rio Grande do Sul segundo o Instituto Rio-Grandense do Arroz esta proporção pode alcançar a 20% (IRGA, 2004).

Geralmente os danos constatados na colheita são maiores quando a toxicidade ocorre no estágio de desenvolvimento vegetativo da plantas de arroz podendo levar a uma quebra completa da safra (ABU et al., 1989; ABRAHAM; PANDEY, 1989), o que vai ser variável em função do nível da toxidez e da tolerância dos cultivares de arroz (BENCKISER et al., 1982; SAHRAWAT; DIATTA, 1996; AUDEBERT; SAHRAWAT, 2004).

O efeito tóxico causado pelo excesso de Fe^{2+} pode se manifestar em uma ampla diversidade de ambientes (BECKER; ASCH, 2005), o que torna essencial um entendimento mais aprofundado de todos os mecanismos envolvidos na homeostase do metal, envolvendo os processos fisiológicos básicos de absorção, transporte e armazenamento do metal na planta (GRUSAK, 2002; GROSS et al., 2003; COLANGELO; GUERINOT, 2006).

O melhoramento genético tem sido um dos grandes responsáveis pelos avanços na agricultura, com o desenvolvimento de cultivares superiores, mais produtivas e adaptadas a ambientes adversos (pragas, moléstias, seca, frio,

salinidade, toxidez por alumínio, ferro, ácidos orgânicos, entre outros), os quais restringem a expressão do potencial produtivo das cultivares.

De acordo com Magalhães Jr. (2005), uma alternativa eficiente para evitar os efeitos da toxicidade por ferro em lavouras de arroz irrigado, cujos solos apresentam histórico de ocorrência do problema, é utilização de cultivares tolerantes, uma vez que existe variabilidade genética para este caráter.

Genótipos de arroz diferem amplamente quanto aos níveis de tolerância à toxidez por ferro, variando em função da fase de desenvolvimento da planta e dos mecanismos moleculares envolvidos neste processo (AKBAR et al., 1987; GUNAWARDENA et al., 1982; MAHADEVAPPA et al., 1991; SAHRAWAT et al., 1996; LUO et al., 1997; BENNETT, 2001; SAHRAWAT, 2004; SHIMIZU et al., 2005; WISSUWA, 2005; MAGALHÃES JR. et al., 2005, 2007; CRESTANI et al., 2009).

Com base nestas considerações este estudo teve como objetivo caracterizar genótipos de arroz irrigado quanto a tolerância ao estresse por ferro sob condições controladas.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal e condições de cultivo

Foram caracterizados neste estudo cinco genótipos de arroz irrigado (*Oryza sativa* L.), BRS-Agrisul, Epagri 108, BR-IRGA 410, BR-IRGA 409 e Nipponbare, oriundos da coleção de trabalho da Embrapa Clima Temperado, quanto a tolerância ao estresse por ferro em sob condições controladas. O estudo foi desenvolvido no Laboratório de Duplo-Haplóides e Hidroponia do Centro de Genômica e Fitomelhoramento (CGF) da Faculdade de Agronomia “Eliseu Maciel” (FAEM), Universidade Federal de Pelotas (UFPEl), Capão do Leão – RS, Brasil.

As sementes passaram por um processo de desinfestação em hipoclorito de sódio 1% durante 10 minutos, após foram lavadas três vezes em água, para posterior acondicionamento em rolos de papel germinador, umedecido com água ultrapura. Posteriormente foram mantidas em câmara de germinação (BOD) a 26°C, com fotoperíodo de 16 horas e umidade relativa de 100% por 72 horas, seguindo os critérios estabelecidos pelas Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 1992).

Plântulas apresentando comprimento de raiz uniforme foram dispostas em telas de náilon, adaptadas a recipientes plásticos de dois litros de capacidade, de modo a manter a raiz permanente em contato com a solução nutritiva padrão para arroz (YOSHIDA et al., 1976) modificada contendo: 40 mg L⁻¹ ((NH₄)₂ SO₄); 10 mg L⁻¹ (KH₂ PO₄); 40 mg L⁻¹ (KNO₃); 40 mg L⁻¹ (CaNO₃); 40 mg L⁻¹ (MgSO₄ 7H₂O); 0.5 mg L⁻¹ (MnSO₄H₂O); 0.05 mg L⁻¹ (Na₂MO O₄ 2H₂O); 0,58 mg L⁻¹ (Nacl); 0.2 mg L⁻¹ (H₃BO₃); 0.01 mg L⁻¹ (ZnSO₄7H₂O), 0.01 mg L⁻¹ (CuSO₄H₂O), 2 mg L⁻¹ (FeSO₄7H₂O), onde permaneceram por 28 dias, tendo a troca do solução nutritiva sido realizada a cada 7 dias. Os recipientes foram mantidos em um tanque hidropônico, com água a uma temperatura de 26 ± 1°C, com fotoperíodo de 16 horas.

Após este período as plântulas foram transferidas para o tratamento controle (solução nutritiva padrão com 2mg L⁻¹ de FeSO₄.7H₂O em pH 4,0 ± 0,1) ou para o tratamento de estresse por de ferro (solução nutritiva padrão com 2000 mg L⁻¹ de FeSO₄.7H₂O em pH 4,0 ± 0,1), onde permaneceram por 3 dias, conforme protocolo descrito por Asch et al. (2005). O pH da solução foi aferido duas vezes ao dia, durante o período de estresse e corrigido através da adição de NaOH 1mol L⁻¹ ou HCl 1N, quando necessário.

Foram mensuradas as variáveis: comprimento de raiz (CR) e comprimento de parte aérea (CPA) em cm. Posteriormente as amostras foram acondicionadas em estufa com circulação a ar a 65°C até atingirem peso constante para subsequente determinação da matéria seca da parte aérea (MSPA). Na sequência foram determinados os teores de cobre (Cu), zinco (Zn), manganês (Mn) e ferro (Fe) acumulado na parte aérea das plântulas, segundo metodologia descrita por Tedesco et al. (1995).

Também foram realizadas avaliações visuais após 3 dias de tratamento com Fe²⁺ na concentração de 2000 mg L⁻¹ conforme protocolo descrito por Asch et al. (2005) seguindo um sistema de pontuação padrão utilizado pelo IRRI, adaptada do Standard Evaluation System for Rice para avaliar sintomas de toxidez por ferro em arroz. Os sintomas visuais foram baseados nas reações de morte das folhas e intensidade de sintomas de toxidez, comparando com as testemunhas. As graduações obedeceram a uma escala variável de 0-9. Plantas resistentes (R) recebem notas de 0-3, as mediantemente resistentes (MR) de 4-5 e as suscetíveis (S) de 6-9 (IRRI, 1975).

Os genótipos utilizados como testemunhas nesta avaliação foram BR-IRGA 409 (sensível) e Epagri 108 (tolerante), caracterizados segundo resultados experimentais a campo e recomendados pela SOSBAI (2007), assim como os demais genótipos avaliados neste estudo.

Delineamento experimental e análise estatística

Foi adotado o delineamento experimental completamente casualizado, em esquema fatorial tratamento x genótipo (2x5) com três repetições, onde a unidade de observação constituiu-se de 20 plantas por genótipo. Os dados foram submetidos à análise de variância, comparação de médias, pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$) e teste de correlação de Pearson utilizando o nível de significância de $P \leq 0.05$. Todas as análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa computacional SAS (SAS LEARNING EDITION, 2002).

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na tabela 1 são apresentados os resultados da análise de variância, que permitem evidenciar variações significativas a 5% de probabilidade de erro pelo teste F para efeito de genótipos e de tratamentos. Foi verificada interação significativa entre os fatores genótipo e tratamento (Gen x Trat) para as variáveis teor de Fe, Zn, Mn e CPA. Indicando que os genótipos avaliados responderam diferencialmente frente aos tratamentos aplicados, de acordo com a análise destas variáveis. Já a variável teor de Cu teve comportamento inalterado em todos os genótipos avaliados assim como em resposta aos diferentes tratamentos. O CR apresentou comportamento diferenciado nos genótipos analisados, no entanto, esta característica não está relacionada ao efeito do tratamento de estresse por ferro, sendo possivelmente uma resposta intrínseca das diferentes constituições genéticas.

De acordo com esta análise podemos destacar as variáveis teor de Fe, Zn, Mn e CPA por apresentarem efeito significativo para interação, podendo ser indicadas como variáveis responsivas a condição de estresse por ferro nos genótipos avaliados neste estudo. Ainda nesta análise é possível constatar que os valores atribuídos ao coeficiente de determinação (R^2) e ao coeficiente de variação (CV) de modo geral indicam confiabilidade aos resultados obtidos (Tabela 1).

Os tratamentos T1 (controle) e T2 (estresse) evidenciaram diferença significativa para a variável teor de Fe. Foi constatado que os genótipos reconhecidamente caracterizados como sensíveis a toxidez por ferro a campo foram os que apresentaram maior acúmulo de ferro nos tecidos. Diferencialmente dos genótipos tolerantes, que também acumularam elevados teores de Fe, no entanto, em concentrações consideravelmente inferiores aquelas encontradas nos genótipos sensíveis, de modo geral, os tolerantes acumularam cerca de 50% menos Fe do que os sensíveis (Figura 1).

Tabela 1. Resumo da análise da variância, para as variáveis; teor de ferro (Fe), cobre (Cu), zinco (Zn) e manganês (Mn) em mg kg^{-1} , comprimento de parte aérea (CPA) e comprimento de raiz (CR) em cm, de cinco genótipos de arroz irrigado avaliados nos tratamentos controle (T1 = solução nutritiva padrão com 2 mg L^{-1} de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), tratamento de estresse (T2 = 2000 mg L^{-1} de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), em solução hidropônica. FAEM/UFPel-CGF, 2010.

Fonte de variação	GL	QM					
		Fe	Cu	Zn	Mn	CPA	CR
Modelo	9	2690122*	6.44	6556.70*	6895.20*	20.40*	6,78*
Tratamento	1	1926664*	4.78	45650.87*	44162.34*	54.02*	5.99
Genótipo	4	616814*	8.60	2285.03*	2353*	29.17*	12,40*
Trat * Gen	4	619299*	4.69	1054.82*	2120*	3.21*	1.36
Erro	20	7464583	4.13	383.24	489	0.72	1.77
Total	29	-	-	-	-	-	-
Média Geral	-	8072.48	18.16	120.26	100.37	31.64	13.33
R ²	-	0.94	0.41	0.88	0.86	0.93	0.63
CV%	-	33.84	11.20	16.27	22.03	2.7	9.98

* Valores significativos a 5% de probabilidade de erro pelo teste F; GL= graus de liberdade; QM= quadrado médio.

Silveira et al. (2007) e Stein et al. (2009) obtiveram resultados semelhantes, plantas sensíveis e tolerantes ambas, acumularam elevados níveis de ferro tanto em tecidos radiculares quanto na parte aérea. No entanto o teor de Fe encontrado no genótipo sensível foi ainda mais elevado do que o observado no genótipo tolerante. Ahlert (2010), analisando dois genótipos de arroz irrigado BR-IRGA 410 (sensível) e Epagri 107 (tolerante), sob condição de estresse por ferro, verificou que ambos os

genótipos apresentaram elevados teores de Fe na parte aérea e na raiz. No entanto nas análises de raiz foi verificado que o acúmulo de Fe foi bem maior no genótipo sensível.

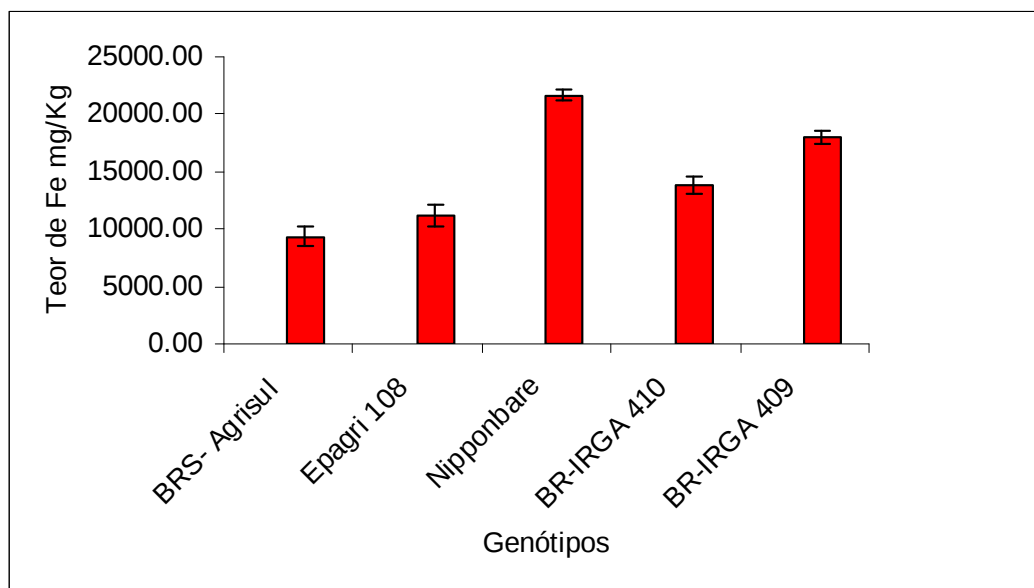


Figura 1. Concentração de ferro (Fe) na parte aérea de cinco genótipos de arroz, submetidos a condição controle ou normal (T1 = solução nutritiva padrão com 2 mg L⁻¹ de FeSO₄.7H₂O) e condição de estresse (T2 = 2000 mg L⁻¹ de FeSO₄.7H₂O).

O teor de Cu acumulado nos tecidos dos genótipos de arroz empregados neste estudo, foi inalterado, não sofreu nenhum acréscimo ou decréscimo em resposta aos tratamentos controle de e estresse por ferro. Esta variável, portanto, não apresenta comportamento diferenciado em virtude da constituição genética analisada nem tão pouco em função dos tratamentos empregados (Figura 2).

Quanto à variável teor de Zn, os genótipos apresentaram comportamento diferenciado. Os genótipos Nipponbare, BR-IRGA 409 e BRS-Agrisul evidenciaram os mais elevados teores de Zn nos tecidos, não diferindo entre si. No entanto, BR-IRGA 410 e Epagri 108 não diferiram do BR-IRGA 409, genótipo que acumulou um dos maiores teores de Zn nos tecidos. Com exceção do genótipo BRS-Agrisul os genótipos que acumularam maiores teores de Fe (genótipos sensíveis), também foram os que acumularam os maiores índices de Zn. No tratamento T2 (estresse) o acúmulo de zinco nos tecidos foi significativamente mais elevado (Figura 2).

A variável teor de Mn teve um comportamento semelhante ao do Fe e Zn. O genótipo Epagri 108 foi o que menos acumulou Mn, não diferindo estatisticamente do BRS- Agrisul e BR-IRGA 410. Desta forma os genótipos tolerantes Epagri 108 e BRS- Agrisul acompanhados do BR-IRGA 410, foram os genótipos que acumularam menos Mn nos tecidos assim com o ocorreu com a variável teor de Fe (Figuras 1 e 2) . Portanto os genótipos que acumularam maiores teores de Mn também foram os que acumularam mais Fe, como descrito anteriormente. No tratamento T2 (estresse) o acúmulo de manganês nos tecidos foi significativamente mais elevado conforme ilustrado na figura 2.

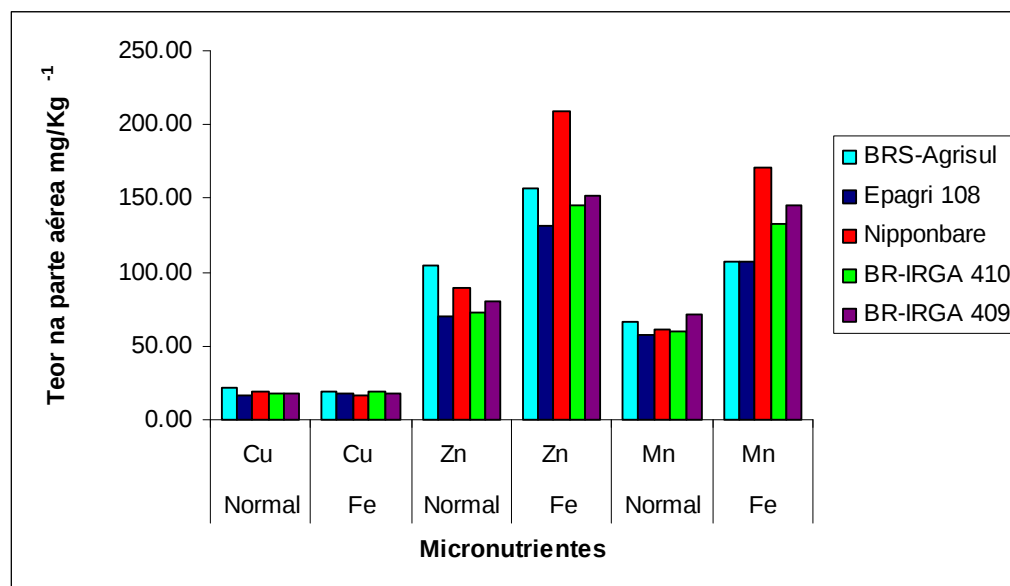


Figura 2. Concentração dos micronutrientes: Cobre (Cu), Zinco (Zn) e Manganês (Mn), na parte aérea de cinco genótipos de arroz, submetidos a condição controle ou normal (T1 = solução nutritiva padrão com 2 mg L⁻¹ de FeSO₄.7H₂O) e condição de estresse (T2 = 2000 mg L⁻¹ de FeSO₄.7H₂O).

Os genótipos, praticamente não diferiram quanto a variável CPA, com exceção do Epagri 108 que evidenciou a menor média (27,42 cm). No entanto, esta variável apresentou redução quando exposta a condição de excesso de Fe, como ilustrado na figura 3. O genótipo BR-IRGA 409 foi o que teve maior redução no CPA. Este resultado é um indício de que, se o tratamento de estresse por ferro fosse

prolongado, possivelmente esta variável responderia de forma mais conclusiva na diferenciação dos genótipos analisados.

A variável CR apresentou comportamento diferenciado nos genótipos avaliados, no entanto esta variação não estava associada aos tratamentos aplicados, tendo em vista que os tratamentos não diferiram entre si, quanto a análise desta variável.

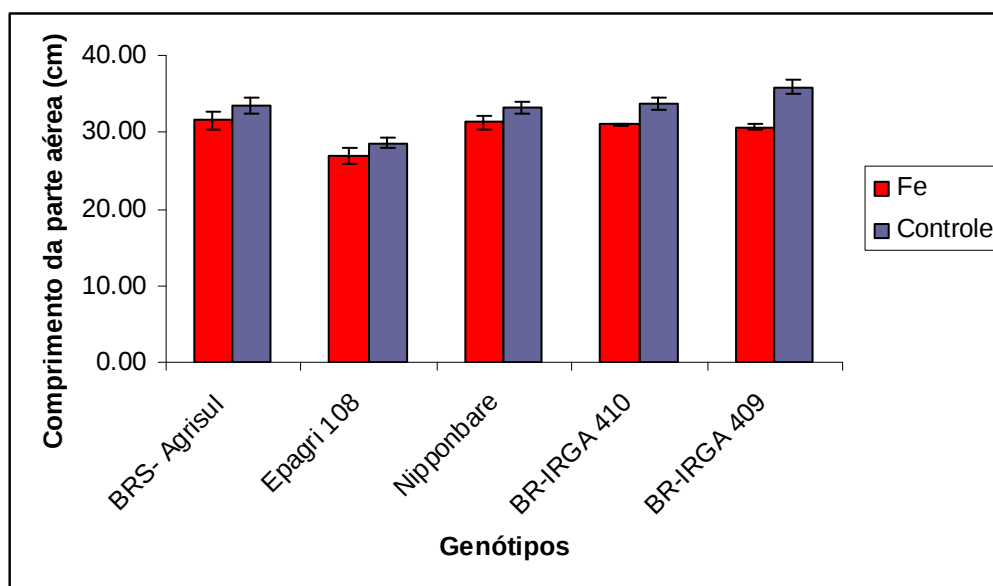


Figura 3. Comprimento de parte aérea (CPA) de cinco genótipos de arroz, submetidos a condição controle ou normal (T1 = solução nutritiva padrão com 2 mg L⁻¹ de FeSO₄.7H₂O) e condição de estresse (T2 = 2000 mg L⁻¹ de FeSO₄.7H₂O).

Através da análise de correlação apresentada na tabela 2, pode ser evidenciado que as variáveis que apresentaram maior correlação significativa positiva foram teor de Fe com Zn (0,93) e Mn (0,97), seguidas pela correlação entre Zn e Mn que foi de 0,92. Estes resultados evidenciam que as variáveis teor de Fe, Zn e Mn sofrem alterações conjuntas, o incremento no acúmulo em uma delas acarreta igualmente no aumento do acúmulo nas duas outras. A variável teor de Fe apresentou correlação negativa significativa com CPA (-0,37) e com CR (-0,42), demonstrando que o acúmulo de ferro nos tecidos acarreta em uma redução significativa sob os índices destas duas variáveis.

Outras correlações que merecem destaque foram de Zn com Mn e CR. Entre Zn e Mn foi verificada correlação significativa positiva (0,92), já em relação a CR

variável Zn apresentou correlação significativa negativa de (-0,38). Mn também apresentou correlação significativa negativa com CR (-0,49) (Tabela 2).

A análise de correlação entre as variáveis empregadas no estudo evidenciou elevada correlação positiva entre Fe, Zn e Mn. Também demonstrou que o aumento do acúmulo destes micronutrientes nos tecidos de plântulas de arroz sob condição de excesso de ferro acarreta em redução do CPA e do CR.

Tabela 2. Coeficiente de Correlação de Pearson entre as variáveis: teor de ferro (Fe), cobre (Cu), zinco (Zn) e manganês (Mn) em mg kg^{-1} , comprimento de parte aérea (CPA) e comprimento de raiz (CR) em cm, de cinco genótipos de arroz irrigado avaliados nos tratamentos controle (T1 = solução nutritiva padrão com 2 mg L^{-1} de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), tratamento de estresse (T2 = 2000 mg L^{-1} de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), em solução hidropônica. FAEM/UFPel-CGF, 2010.

Variáveis	Fe	Cu	Zn	Mn	CPA	CR
Fe	1	-0.19	0.93*	0.97*	-0.37*	-0.42*
Cu		1	-0.02	-0.19	0.24	0.26
Zn			1	0.92*	-0.27	-0.38*
Mn				1	-0.30	-0.49*
CPA					1	0.08
CR						1

* Significante ao nível de 0.05 de probabilidade.

Os micronutrientes avaliados neste estudo (Cu, Fe, Zn e Mn) são essenciais para o desenvolvimento das plantas. No entanto, quando absorvidos em excesso pelos tecidos vegetais podem acarretar em problemas de toxidez. Estes metais compartilham algumas características em comum, entre eles podemos destacar que em condição de baixo pH do solo o processo químico que resulta na redução dos íons para Cu^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} e Mn^{2+} torna estes micronutrientes mais disponíveis para serem absorvidos pelas plantas (PITTMAN, 2005; GROTZ; GUERINOT, 2006).

Desta forma as plantas precisam equilibrar a captação, armazenamento e utilização destes metais a fim de manter uma adequada homeostase destes íons (GROTZ; GUERINOT, 2006). Ainda segundo estes autores, embora estes metais possam ser transportados por uma variedade de transportadores, alguns transportadores apresentam especificidade por um determinado íon em particular.

Como a maioria dos genes transportadores de Fe^{2+} também são capazes de transportar outros cátions divalentes incluindo Zn^{2+} , Mn^{2+} e Cu^{2+} (ECKHARDT et al., 2001; GROSS et al., 2003; LÓPEZ-MILLÁN et al., 2004; PITTMAN, 2005; GROTZ; GUERINOT, 2006; NARAYANAN et al., 2007; PALMER; GUERINOT, 2009) é possível que os genes ativados para realizar o transporte de Fe^{2+} também tenham sido responsáveis pelo transporte de Zn e Mn que também apresentaram aumento de acúmulo nos tecidos sob a condição de excesso de ferro utilizada neste estudo.

Apesar dos recentes avanços na compreensão da homeostase dos metais em plantas, muitas questões ainda precisam ser elucidadas. Ainda não está claro como é desencadeado o processo de distribuição dos metais na planta para os locais onde estes se fazem necessários. Ao nível celular, os mecanismos envolvidos no transporte dos metais nas mitocôndrias e cloroplastos ainda não estão totalmente compreendidos. Tendo em vista a função essencial de metais como Fe, Cu, Zn e Mn, será de grande importância saber quais transportadores regulam o transporte desse metais nestes compartimentos vegetais (PITTMAN, 2005).

A caracterização de plantas quanto a tolerância a toxidez por ferro, além de permitir a recomendação de cultivares adaptadas a esta condição de cultivo, permitindo a produção de arroz em áreas que apresentam ou podem vir a apresentar o problema, também pode contribuir para o aumento da compreensão de como as plantas podem se adaptar a essas condições de estresse, tornando possível a identificação de genes responsáveis pelo transporte destes íons, melhorando substancialmente a compreensão da homeostase dos metais em plantas.

Na tabela 3 pode ser verificado o comportamento dos genótipos empregados no estudo sob a condição de toxidez por Fe^{2+} , classificados por meio de avaliações visuais quanto a tolerância e sensibilidade a toxidez por ferro. Os sintomas visuais foram baseados nas reações de morte das folhas e intensidade de amarelecimento das mesmas, em comparação com as testemunhas conforme descrito por Bacha (1993), com algumas adaptações, tendo em vista que os sintomas detectados neste estudo foram sintomas iniciais de toxidez direta e não indireta como relatado pelo autor.

Os sintomas detectados nas plantas submetidas a condição de toxidez por ferro foram os seguintes: as folhas desenvolveram uma coloração castanha (amarelo queimado). Também foram verificadas pontuações de coloração castanha ao

longo de toda a folha e as extremidades superiores as folhas também demonstravam aparência de queimado (seca), como pode ser visualizado na figura 4 (a, b e c).

Tabela 3. Sintomas visuais avaliados em cinco genótipos de arroz irrigado sob os tratamentos: controle (T1 = solução nutritiva padrão com 2 mg L⁻¹ de FeSO₄.7H₂O), tratamento de estresse (T2 = 2000 mg L⁻¹ de FeSO₄.7H₂O), em solução hidropônica. As graduações obedecem a uma escala variável de 0 a 9, adaptada do Standard Evaluation System for Rice utilizada pelo IRRI. FAEM/UFPeI-CGF, 2010.

Genótipo	R1	R2	R3	Média	Classificação
Epagri 108	2	1	2	1.7	R
BRS-Agrisul	2	4	3	3.0	R
BR-IRGA 410	5	4	6	5.0	MR
Nipponbare	7	8	8	7.7	S
BR-IRGA 409	6	7	7	6.7	S

R1, R2 e R3 = repetições experimentais; Classificação quanto ao nível de tolerância a toxidez por ferro = R (resistente 0-3), MR (moderadamente resistente 4-5) e S (sensível 6-9).

De acordo com estes sintomas visuais, os genótipos foram classificados quanto a tolerância a toxidez por ferro sob condição controlada, como demonstrado na tabela 3, e os resultados encontrados concordam com aqueles mencionados na literatura com referência a estes genótipos em condições de campo experimental.

Os mesmos genótipos classificados como sensíveis a toxidez por ferro, que foram os genótipos que apresentam sintomas mais evidentes de toxidez através da análise visual, foram também os que apresentaram maior acúmulo de ferro na parte aérea das plântulas como demonstrado na figura 5.



Figura 4. Sintomas visuais de toxidez por ferro (a, b e c), observados em folhas de plântulas de arroz após 3 dias sob condição de estresse (2000 mg L^{-1} de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$).

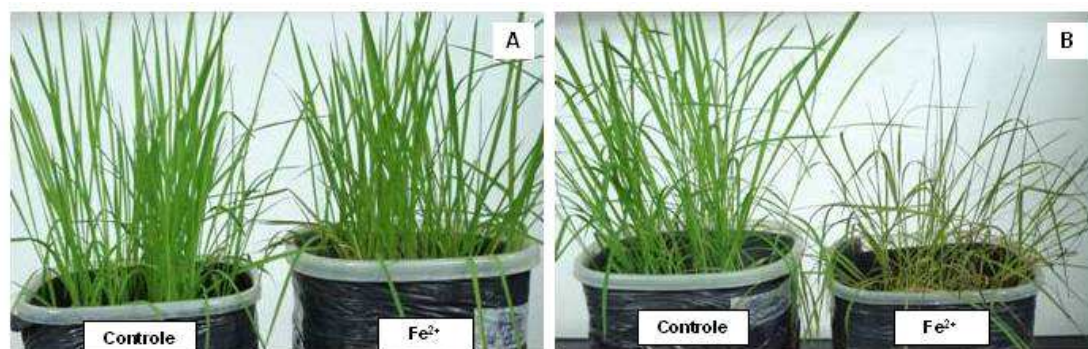


Figura 5. Comportamento dos genótipos A (Epagri 108) e B (BR-IRGA 409) observados no tratamento controle (solução nutritiva padrão com 2 mg L^{-1} de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) e de Fe^{2+} (2000 mg L^{-1} de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$).

5.4 CONCLUSÕES

O sistema hidropônico demonstra eficiência na caracterização dos genótipos quanto a tolerância a toxidez por ferro.

Os genótipos caracterizados, como sensíveis a toxidez por ferro neste estudo, BR-IRGA 409 e Nipponbare, também foram os que apresentaram o maior acúmulo de Fe^{2+} na parte aérea.

O aumento do acúmulo de Fe^{2+} nos tecidos sob condição de excesso do íon na solução apresenta correlação com o aumento Zn e Mn nestes mesmos tecidos.

5.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAM, M. J.; PANDEY, D. K. Performance of selected varieties and advanced generation genotypes in rainfed lowland Fetoxic soil. **Int. Rice Res. Newsl.** v. 14, p.21–21. 1989.

ABU, M. B.; TUCKER, E. S.; HARDING, S. S.; SESAY, J. S. Cultural practices to reduce iron toxicity in rice. **Int. Rice Res. Newsl.** v.14, p.19–19. 1989.

AHLERT, R. J. **Análise proteômica diferencial em raízes de plântulas de arroz (*Oryza sativa* L.) submetidas ao estresse por ferro.** Dissertação de mestrado (Mestrado em ciências) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2010.

AKBAR, M.; GUNAWARDENA, I.; PONNAMPERUMA, N. Breeding for soil stresses: **Progress in rainfed lowland rice.** IRRI, Los Banos, The Philippines. p.263–272.1987.

ASCH, F.; BECKER, M.; KPONGOR, D. S. A quick and efficient screen for resistance to iron toxicity in lowland rice, **J. Plant Nutr.Soil Sci.** v.168, n.6, p.764-773, 2005.

AUDEBERT, A., SAHRAWAT, K. L. Mechanisms for iron toxicity tolerance in lowland rice. **J. Plant Nutr.** v. 23, p.1877-1885. 2000.

BACHA, R. Avaliação de linhagens e cultivares de arroz irrigado para condições adversas de solo: toxidez por ferro. 19, 1993. In: Reunião da Cultura do Arroz Irrigado, Balneário Camburiú. **Anais.** Florianópolis: EMPASC, 1993.p.156-159.

BACHA, R. E. Avaliação de linhagens e cultivares de arroz irrigado para condições adversas de solo: toxidez por ferro. 19, 1991. In: Reunião da Cultura do Arroz Irrigado, Balneário Camburiú. **Anais.** Florianópolis: EMPASC, 1991.p.156-159.

BECKER, M.; ASCH, F. Iron toxicity in rice-conditions and management concepts, **J. Plant Nutr. Soil Sci.** v.168, n.4, p.558-573. 2005.

BENCKISER, G., OTTOW, J. C. G., SANTIAGO, S., WATANABE, I. Physiochemical characterization of iron-toxic soils in some Asian countries. IRRI research paper series 85. **The International Rice Research Institute**, Los Banos, The Philippines.1982.

BENNETT, J. Status of breeding for tolerance of abiotic stresses and prospects for use of molecular techniques. TAC Secretariat, **Food and Agriculture Organization-FAO**, Rome. 2001.

BRASIL. Ministério da Agricultura e da Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília, DF: SNDA/DNDV/CLAV. 365p, 1992.

BRIAT, J.F.; LOBREAUX, S. Iron transport and storage in plants. **Trends in Plant Science.** v. 2, p.187-193. 1997.

COLANGELO, E. P.; GUERINOT, M. L. Put the metal to the petal: metal uptake and transport throughout plants. **Plant Biol.** v.9, p. 322 e 330. 2006.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento de safra brasileira: grãos, sexto levantamento, publicação mensal (março), Brasília. 42 p. 2010.

CRESTANI, M.; SOUZA, V.Q.; SILVA, J. A. G.; HARTWIG, I.; LUCHE, H. S. de; SOUSA, R. O de.; CARVALHO, F. F. I. de. Comportamento de genótipos de arroz irrigado submetidos ao estresse por ferro em condições de hidroponia. **Crop Breeding and Applied Biotechnology.** v. 9, p.85-93, 2009.

DOBERMANN, A.; FAIRHURST, T. Rice: Nutrient disorders and nutrient management. **The International Rice Research Institute**, Manila, Philippines.2000.

EATON, J.W.; QIAN, M. Molecular bases of cellular iron toxicity. **Free Radical Biology & Medicine.** v.32, p.833-840. 2002.

ECKHARDT, U.; MAS MARQUES, A.; BUCKHOUT, T.J. Two-iron regulated cation transporters from tomato complement metal uptake-deficient yeast mutants. **Plant Mol Biol.** v.45, p.437–448. 2001.

FANG, W.C.; WANG, J.W.; LIN, C.C.; KAO, C.H. Iron induction of lipid peroxidation and effects on antioxidative enzyme activities in rice leaves. **Plant Growth Regulation.** v. 35, p.75-80. 2001.

GROSS, J.; STEIN, R.J.; FETT-NETO, A.G.; FETT, J.P. Iron homeostasis related genes in rice. **Genetics and Molecular Biology.** v.26. n.4, p.477-497. 2003.

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

GRUSAK, M.A. Enhancing mineral content in plant food products. **Journal of the American College of Nutrition**. v. 21, p.178S-183S. 2002.

GUNAWARDENA, I.; VIRMANI, S. S.; SUMO, F. J. Breeding rice for tolerance to iron toxicity. *Oryza* 19, 5–12. Gupta, A. S., Webb, R. P., Holaday, A. S., Allen, R. D. Overexpression of superoxide dismutase protects plants from oxidative stress. **Plant Physiol.** v.103, p.1067–1073.1982.

HOWELER, R.H. Iron-induced orange disease of rice in relation to physico-chemical changes in a flooded oxisol. Soil Science Society of America. **Proceedings**, Madison, v.37, p. 898-993, 1973.

INSTITUTO RIO-GRANDENSE DO ARROZ (IRGA). **Arroz irrigado no RS**: área cultivada, produção, nº de engenhos e beneficiamento. Disponível em: <http://www.irga.rs.gov.br>. Acesso em: 2004.

INTERNATIONAL RICE - RESEARCH INSTITUTE. **Standard evaluation system for rice**. Los Banos, IRRI, 1975.

LANTIN, R.S.; NEUE, H.V. **Iron toxicity: a nutritional disorder in wetland rice**. In: REUNIÃO DA CULTURA DO ARROZ IRRIGADO, 18, Pelotas, 1988. Anais. Pelotas: 1988. 16p. Palestra apresentada.

LOBRÉAXU, S.; MASSENET, O.; BRIAT, J-F. Iron induces ferritin synthesis in maize plantlets. **Plant Molecular Biology**. v.19, p. 563 – 575.1992.

LÓPEZ-MILLÁN, A. F.; ELLIS, D. R.; GRUSAK, M. A. Identification and characterization of several new members of the ZIP family of metal ion transporters in *Medicago truncatula*. **Plant Molecular Biology**. v.54, p.583–596. 2004.

LUO, A.; JING, G.; WU, P.; NI, J.; JIANG, S.; ZHANG, Y. Rice genotype differences in nutrient status under excessive ferric iron conditions. **J. Plant Nutr.** v.20, p.1361-1373.1997.

MAGALHÃES JR, A. M de; FAGUNDES, P. R. R; GOMES, A.S; FRANCO, D. F.; SEVERO, A. Seleção de linhagens de arroz irrigado do programa de melhoramento da Embrapa à toxicidade por ferro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ARROZ IRRIGADO, 4; REUNIÃO DA CULTURA DO ARROZ IRRIGADO, 26, 2005, Santa Maria. **Anais**. Santa Maria: UFSM, 2005. p. 204-206.

MAGALHÃES JR, A. M de; FAGUNDES, P. R. R; GOMES, A.S; FRANCO, D. F.; SEVERO, A. Avaliação de linhagens de arroz irrigado à toxicidade por ferro do programa de

melhoramento da Embrapa. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ARROZ IRRIGADO, 5; REUNIÃO DA CULTURA DO ARROZ IRRIGADO, 27, 2007, Pelotas. **Anais**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2007. p. 108-111.

MAHADEVAPPA, M.; BULBULE, A. V.; SIDDARAMAPPA, R.; KULKARNI, R. S. Field screening of rice cultivars for growth, yield and nutrient uptake in acidic soil. **Plant Soil Sci.** v.45, p.959–965.1991.

MEURER, E.J. **Fundamentos de química do solo**. Porto Alegre: Gênese, 2000, 174p

NARAYANAN, N. N.; VASCONCELOS, W.M.; GRUSAK, A.M. Expression profiling de *Oryza sativa* metal homeostasis genes in different rice cultivars using a cDNA macroarray. **Plant Physiology and Biochemistry**. v.45, p.277-286. 2007.

PALMER, C. M.; GUERINOT, M. L. Facing the challenges of Cu, Fe and Zn homeostasis in plants. **Nature Chemical Biology**. v.5, n.5, p.333-340. 2009.

PITTMAN, J. K. Managing the manganese: molecular mechanisms of manganese transport and homeostasis. **New Phytologist**. v.167, p.733–742. 2005.

PONNAMPERUMA, F.N. The chemistry of submerged soils. **Advanced Agronomy**. v.24, p.29-96, 1972.

PRADE, K.; OTTOW, J. C. G.; JACQ, V. A. Excessive iron uptake (iron toxicity) by wetland rice (*Oryza sativa* L.) on an acid sulphate soil in the Casamance /Senegal. International Institute for Land Reclamation and Improvement, Wageningen, The Netherlands. **ILRI Publication**. v. 44, p.150–162. 1993.

RATERING, S.; SCHNELL, S. Localization of iron-reducing activity in paddy soil by profile studies. **Biogeochem**. v. 48, p.341–365. 2000.

SAHRAWAT, K. L. Iron toxicity in wetland rice and the role of other nutrients. **Journal Plant Nutr.** v..27, p.1471-1504, 2004.

SAHRAWAT, K. L.; DIATTA, S. Nutrient management and season affect soil iron toxicity, in West Africa Rice Development Association: **Annual Report 1995**, p. 34–35.1996.

SHIMIZU, H.; SATO, K.; BERBERICH, T.; MIYAZAKI, A.; OZAKI, R.; IMAI, R.; KUSANO, T. LIP19, a basic region leucine zipper protein, is a Fos-like molecular switch in the cold signaling of rice plants. **Plant Cell Physiol**. v.46, p.1623–1634. 2005.

SILVEIRA, V. C.; OLIVEIRA, A. P.; SPEROTTO, R. A.; ESPINDOLA, L. S.; AMARAL, L.; DIAS, J. F.; CUNHA, J. B.; FETT, J. P. Influence of iron on mineral status of two rice (*Oryza sativa* L.) cultivars. **Brazilian Journal of Plant Physiology**. v.19, p.127-139. 2007.

SOSBAI – Sociedade Sul-Brasileira de Arroz Irrigado **Arroz irrigado: recomendações técnicas da pesquisa para o Sul do Brasil**. Pelotas: SOSBAI, 2007. 164 p.

SOUSA, R. O. de; CAMARGO, F. A. O.; VAHL, L. C. Solos alagados – Reações de Redox. In: MEURER, E.J. (3 ed.). **Fundamentos de química do solo**. Editora Evangraf, Porto Alegre, p.185-211. 2006.

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM. **SAS: Statistical Analysis System-Getting Started with the SAS Learning Edition**. Cary, NC: SAS Institute Inc., 2002. 86p.

STEIN, R. J.; DUARTE, G. L.; SPOHR, M. G.; LOPES, S. I. G.; FETT, J. P. Distinct physiological responses of two rice cultivars subjected to iron toxicity under field conditions. **Ann Appl Biol**. v.154, p. 269–277. 2009.

TADANO, T. Devices of rice roots to tolerate high iron concentration in growth media. **Japanese Agricultural Research Quart (JARQ)**. v. 9, n.1, p.34–39.1975.

TADANO, T.; YOSHIDA, S. Chemical changes in submerged soils and their effect on rice growth, in IRRI: Soils and Rice. **The International Rice Research Institute**, Manila, The hilippines, p. 399–420. 1978.

TAIZ, L., ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

TEDESCO, M. J.; GIANELLO, C.; BISSANI, C. A.; BOHNEN, H.; VOLKWEISS, S. J. **Análises de solo, planta e outros materiais**. 2. ed. Porto Alegre: Departamento de Solos, Faculdade de Agronomia, UFRGS, 1995. 174p. (Boletim técnico, n.5).

VAHL, L.C. **Toxidez de ferro em genótipos de arroz irrigado por alagamento**. Porto Alegre. Tese (Doutorado em Ciência do Solo), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1991.

VAHL, L. C.; LOPES, S. I. G. Nutrição de plantas. In: PESQUE, S. T.; NEDEL, J. L.; BARROS, A. C. S. A. (Eds.) **Produção de arroz irrigado**. Pelotas: Editora e Gráfica Universitária, UFPel, 3ª ed., 2004, p.149-206.

WISSUWA, M. Combining a modeling with a genetic approach in establishing associations between genetic and physiological effects in relation to phosphorus uptake. **Plant and Soil**. v.269, n.1/2, p.57-68. 2005.

YOSHIDA, S. **Fundamentals of rice crop science**. The International Rice Research Institute, Phillippines, 269p. 1981.

YOSHIDA, S.; FORNO, D. A.; COCK, J. H.; GOMEZ, K. A. **Laboratory Manual for Physiological Studies of Rice**. The international rice research institute (IRRI). Los Baños, Laguna, Philippines. 1976.

6. CAPÍTULO V

ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS GENES *OsFRDL1*, *OsNRAMP1* E *OsNRAMP2*, EM GENÓTIPOS DE ARROZ CONTRASTANTES QUANTO À TOLERÂNCIA AO ESTRESSE POR FERRO

6.1 INTRODUÇÃO

O efeito tóxico causado pelo excesso de Fe^{2+} pode se manifestar em uma ampla diversidade de ambientes, o que torna o conhecimento sobre a fisiologia do estresse mais relevante na busca por uma solução eficaz para o problema (BECKER; ASCH, 2005). Sendo a toxidez por ferro um dos mais importantes estresses abióticos a limitar a produção do arroz irrigado em nível mundial (DOBERMANN; FAIRHURST, 2000), o conhecimento dos mecanismos envolvidos na homeostase do metal, incluindo os processos fisiológicos básicos de absorção, transporte e armazenamento do ferro na planta, é de extrema importância (GRUSAK, 2002; GROSS et al., 2003; COLANGELO; GUERINOT, 2006), pois poderá ser utilizado no desenvolvimento de cultivares de arroz, tolerantes ao estresse por Fe^{2+} .

O genoma do arroz (*Oryza sativa* L.) subsp. *japonica* cv. Nipponbare apresenta-se completamente seqüenciado (IRGSP, 2005), sendo considerado um genoma modelo entre as poáceas (BII, 2010) e servindo como uma importante ferramenta no desenvolvimento de estudos comparativos de genômica funcional e estrutural dentro desta família, possibilitando que todos os conhecimentos obtidos com esta espécie também possam vir a beneficiar os demais cereais.

A adaptação e aclimação a um determinado estresse ambiental resultam de eventos integrados que ocorrem em todos os níveis de organização, desde o anatômico e morfológico até o celular, bioquímico e molecular (TAIZ; ZEIGER, 2004). Várias são as vias de percepção e de sinalização do estresse; algumas são

específicas, outras não, podendo gerar uma rede de interações no sistema de transdução de sinais (FUJITA et al., 2006). O entendimento dos eventos moleculares ligados a percepção de um sinal de estresse que levam a tolerância é de grande valia, e tem sido buscado exaustivamente pela pesquisa. Todas estas respostas, no entanto, estão diretamente relacionadas à regulação da expressão dos genes envolvidos na resposta a um determinado estímulo.

De acordo com Gross et al. (2003), várias famílias gênicas estão envolvidas na homeostase do ferro. Já foram identificados 43 genes potencialmente envolvidos no processo, que podem ser expressos em diferentes estágios de desenvolvimento e tecidos da planta. Estes têm sido estudados em várias espécies de plantas e importantes avanços já foram feitos, buscando a elucidação dos mecanismos envolvidos no metabolismo do ferro. No entanto, devido à grande complexidade destes mecanismos, muito ainda precisa ser feito no intuito de elucidar todos os eventos tanto fisiológicos, quanto moleculares envolvidos na resposta a condições tanto de excesso quanto de deficiência de ferro.

As principais famílias gênicas envolvidas na homeostase de ferro em plantas são *Yellow Stripe Like* (YSL), *Natural Resistance Associated Macrophage Proteins* (NRAMP), *Nicotianamine Sintase* (NAS), *Iron Regulated Transporter* (IRT) e *Ferric Reductase Oxidase* (FRO) (CURIE et al., 2003). No xilema o Fe^{3+} é quelado ao citrato que é o principal quelante de metais neste tecido (CATALDO et al., 1988; CURIE; BRIAT, 2003), constituindo o complexo Fe^{3+} -citrato. Proteínas pertencentes à família MATE (*Multidrug and Toxic Compound Extrusion*) estão envolvidas no transporte de citrato em plantas (HE et al., 2004). Em *Arabidopsis* foi evidenciado que o gene *AtFRD3* (*Ferric Reductase Defective3*), pertencente à esta família, atua no transporte de citrato, componente necessário para que ocorra a translocação de ferro das raízes para a parte aérea (GREEN; ROGERS, 2004; DURRET et al., 2007).

No genoma do arroz foram identificados seis homólogos de genes pertencentes à família MATE de *Arabidopsis*, caracterizados como *OsFRDL* (*Ferric Reductase Defective-like*). Entre eles um transportador de Fe^{3+} -citrato via xilema denominado de *OsFRDL1* (*Ferric Reductase Defective-like1*) (YOKOSHO et al., 2009).

Nas folhas, o complexo Fe^{3+} -citrato é reduzido para posteriormente ser transportado por proteínas transportadoras de cátions divalentes através da

membrana plasmática. De acordo com Inoue et al. (2004) o gene *OsFRDL1* é um transportador que reside na membrana plasmática das células envolvidas no transporte de Fe a longa distância.

As NRAMP são proteínas integrais de membrana envolvidas no transporte de ferro em vários organismos (procariotos e eucariotos), sendo os genes que constituem esta família altamente conservados (CELLIER et al., 2001) e amplamente distribuídos na planta e em todas as famílias de plantas, estando envolvidos principalmente no transporte de cátions divalentes como Mn^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Cd^{2+} , Ni^{2+} e Co^{2+} (NEVO; NELSON, 2004).

No genoma do arroz oito genes foram relacionados à família NRAMP. Cinco destes são genes prováveis, pois ainda não foram caracterizados quanto a sua possível localização e função nas células (GROSS et al., 2003). Os demais (*OsNRAMP1*, *OsNRAMP2* e *OsNRAMP3*), foram clonados e caracterizados na espécie, sendo expressos em diferentes órgãos da planta. *OsNRAMP1* é preferencialmente expresso em raízes, *OsNRAMP2* em folhas e *OsNRAMP3* é expresso em níveis semelhantes tanto em folhas quanto em raízes (BELOUCHI et al., 1997, CURIE et al., 2000).

Thomine et al. (2000) evidenciaram o aumento de expressão do *OsNRAMP1* em condições de deficiência de ferro, relacionando o gene a absorção de Fe do solo e sugerem que esteja envolvido na remobilização do Fe para o citosol sob condições de deficiência do mesmo. Recentemente Narayanan et al. (2007) relataram que os genes *OsNRAMP2*, *OsNRAMP4* e *OsNRAMP7* são superexpressos em folhas, de modo geral, durante o estágio de enchimento do grão de arroz.

Em plantas, principalmente sob condição de estresse por excesso de ferro, tendo em vista que grande parte das pesquisas com estes genes são realizadas em condições de deficiência e não de toxidez, muitos mecanismos envolvidos no metabolismo do metal, ainda precisam ser elucidados. Para uma adequada compreensão destes mecanismos, análises de expressão gênica podem ser empregadas com sucesso.

Considerando a necessidade e a importância do estudo da tolerância ao estresse por ferro em arroz, este trabalho teve como objetivo analisar o perfil de expressão dos genes *OsFRDL1*, *OsNRAMP1* e *OsNRAMP2* envolvidos na homeostase do metal, em genótipos de arroz contrastantes quanto a tolerância ao

estresse por ferro, visando a elucidação de mecanismos envolvidos no metabolismo do metal. Tal estudo acarretará em contribuições aos programas de melhoramento da espécie e demais espécies relacionadas, por representar o arroz uma espécie modelo entre as poáceas, o que possibilita o emprego dos resultados obtidos neste estudo com arroz, no melhoramento de outros cereais.

6.2 MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal e condições de cultivo

Três genótipos de arroz irrigado (*Oryza sativa* L.), dois pertencentes a subespécie *indica* (BR-IRGA 410, Epagri 108) e um a subespécie *japonica* (Nipponbare), oriundos da coleção de trabalho da Embrapa Clima Temperado, foram cultivados sob condição hidropônica e ambiente controlado, no Laboratório de Duplo-Haplóides e Hidroponia do Centro de Genômica e Fitomelhoramento (CGF) da Faculdade de Agronomia “Eliseu Maciel” (FAEM), Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Capão do Leão – RS, Brasil.

Para o estabelecimento do experimento, as sementes utilizadas passaram por processo de desinfestação em hipoclorito de sódio 1% durante 10 minutos, após foram lavadas três vezes em água, para posterior acondicionamento em rolos de papel germinador, umedecido com água ultrapura. Posteriormente foram mantidas em câmara de germinação (BOD) a 26°C, com fotoperíodo de 16 horas e umidade relativa de 100% por 72 horas, seguindo os critérios estabelecidos pelas Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 1992).

Plântulas uniformes foram transferidas para tela de nylon adaptada à tampa de um recipiente com capacidade para 4 L, contendo solução nutritiva padrão para arroz (YOSHIDA et al., 1976) modificada contendo: 40 mg L⁻¹ ((NH₄)₂ SO₄); 10 mg L⁻¹ (KH₂ PO₄); 40 mg L⁻¹ (KNO₃); 40 mg L⁻¹ (CaNO₃); 40 mg L⁻¹ (MgSO₄ · 7H₂O); 0.5 mg L⁻¹ (MnSO₄ H₂O); 0.05 mg L⁻¹ (Na₂MO O₄ 2H₂O); 0,58 mg L⁻¹ (NaCl); 0.2 mg L⁻¹ (H₃BO₃); 0.01 mg L⁻¹ (ZnSO₄ · 7H₂O), 0.01 mg L⁻¹ (CuSO₄ · 5H₂O), 2 mg L⁻¹ (FeSO₄.7H₂O).

Os recipientes foram acondicionados em um tanque hidropônico, com água a uma temperatura de 25 ± 1°C, com fotoperíodo de 16 horas onde permaneceram por 14 dias, sendo a troca da solução realizada a cada 7 dias. Após este período as

plântulas foram transferidas para recipientes contendo solução nutritiva padrão, descrita no parágrafo anterior, acrescida com 500 mg L⁻¹ de FeSO₄.7H₂O em pH 4,0 ± 0,1), conforme protocolo descrito por Silveira et al. (2007), tendo o pH da solução sido aferido a cada coleta de material vegetal.

Foram realizadas coletas nos tempos 0; 6; 12, 18 e 24 horas, após a exposição das plantas ao estresse por Fe²⁺. Tecidos de raízes e parte aérea das plantas foram coletados separadamente, lavados em água ultrapura autoclavada e imediatamente acondicionados em N₂ líquido e posteriormente, armazenadas a -80°C até a extração do RNA. O delineamento experimental adotado foi completamente casualizado.

Extração de RNA

As extrações foram realizadas em triplicatas biológicas, raízes e parte aérea foram maceradas separadamente em N₂ líquido e transferidas para tubos eppendorf de 2 mL contendo 1 mL de reagente TRIzol® (Invitrogen, Califórnia, USA). A mistura foi homogeneizada em aparelho tipo *vortex* e incubada por 10 minutos à temperatura ambiente. O homogenato foi, então, centrifugado a 12.000 rpm, por 10 minutos, a 4°C (Eppendorf 5810R, Rotor F 45-30-11, USA). E o sobrenadante transferido para um novo eppendorf de 1,5 mL ao qual foram adicionados 200 µL de clorofórmio gelado a fim de promover a solubilização dos lipídeos. Na sequência os tubos sofreram inversão manual por 15 segundos e após foram incubados a temperatura ambiente por sete minutos e centrifugados a 12.000 rpm por 15 minutos a 4°C. A precipitação do RNA da fase aquosa foi realizada através da adição, seguida de incubação à temperatura ambiente por 10 minutos, de ½ volume de isopropanol e ½ de citrato de Na 0,5M + NaCl 1,2M (armazenados a 4°C), com posterior centrifugação a 12.000 rpm por 10 minutos a 4°C.

O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspensionado em 1 mL de etanol 70% a 4°C e centrifugado a 7.000 rpm por 5 minutos a 4°C. O RNA precipitado permaneceu em temperatura ambiente até a eliminação do excesso de álcool. Posteriormente, o mesmo foi ressuspensionado em 30 µL de água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC, GIBCO BRL) e armazenado a 4°C até o dia seguinte, quando foi avaliado em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo quanto a sua integridade para posterior quantificação por espectrofotometria

(espectrofotômetro Hitachi, modelo U-1800), com base na relação da absorbância A260nm/A280nm.

Síntese de cDNA

As amostras de RNA, foram tratadas com a enzima Dnase I (*Amplification Grade Dnase I*, Invitrogen™), e posteriormente foi realizada a síntese da primeira fita de cDNA utilizando o KIT *SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR* (Invitrogen™) de acordo com as recomendações do fabricante.

qRT-PCR em Tempo Real

Nesta etapa foi analisado o nível de expressão de alguns genes pertencentes às seguintes famílias gênicas envolvidas na homeostase de ferro em arroz: MATE (*OsFRDL1*) e NRAMP (*OsNRAMP1*, *OsNRAMP2*) em cinco diferentes tempos de exposição ao estresse por Fe²⁺ (0; 6; 12, 18 e 24 horas). Os dados de expressão dos genes “alvo”, foram normalizados em relação ao nível de expressão do gene endógeno Ubiquitina5 (*UBQ5*), utilizado como padrão de referência (JAIN et al., 2006).

As sequências dos iniciadores analisados foram obtidas no banco de dados do NCBI (*National Center of Biotechnology Information*), referentes a genes descritos para o genoma do arroz (*Oryza sativa* subsp *japonica* cv Nipponbare), oriundos da anotação versão 3 do RAP-DB (*Rice Annotation Project Database*) disponibilizada pelo IRGSP (*International Rice Genome Sequence Project*) que são demonstrados na tabela 1. Estas foram selecionadas com base em alguns critérios como: tamanho do produto de amplificação (*amplicon*), o qual deve ficar entre 50 e 150 pb; conteúdo CG entre 40 e 60% e temperatura de anelamento variando entre 60-65°C, conforme recomendação da Applied Biosystems®. O tamanho dos produtos de amplificação e a especificidade de cada gene analisado foi verificada em gel de agarose (3% w/v) antes do início das reações de qRT-PCR.

O procedimento de validação experimental foi realizado, para cada tipo de tecido analisado (raiz e parte aérea), utilizando amostras de cDNA (tecidos de raiz e de parte aérea do genótipo BR-IRGA 410 no tempo 0h de exposição ao Fe²⁺) em diluições seriadas de 1; 1:5, 1:25 e 1:125. Esta amplificação gerou uma curva

padrão representada através de um gráfico de regressão linear semi-log do valor Ct em comparação ao log da quantidade inicial de ácido nucléico, apresentando um valor denominado de *slope*. O *slope* é a inclinação da curva padrão gerada pelos dados: log da concentração das amostras x Ct (*Threshold Cycle*: ciclo em que cada curva de amplificação atravessa o *Threshold*, servindo como base para comparação entre amostras), sendo comumente usado para estimar a eficiência de amplificação de uma reação de PCR em tempo real (Applied Biosystems /suporte@appliedbiosystems.com).

O desempenho da qRT-PCR em tempo real foi determinado através do cálculo da eficiência utilizando a fórmula: $E = (10^{(-1/\text{slope})})$ descrita por Rasmussen (2001).

O valor da eficiência deve ser próximo a 100% (100 ± 10) e deve ser semelhante entre controle endógeno e gene alvo. O valor de R^2 , também gerado a partir da curva padrão, indica o quanto as réplicas estão parecidas, ou seja, indica o grau de confiabilidade dos dados. Após o cálculo das eficiências de amplificação individuais dos genes alvo e endógeno foi construído um gráfico representativo da validação experimental. No eixo X são apresentados os valores de log da concentração das amostras e no eixo Y a diferença entre a média do Ct do gene de interesse e a média do Ct do controle endógeno (ΔCt), normalizando a amplificação do gene alvo e do endógeno. O valor da inclinação da curva deve ficar entre -0,1 e 0,1 (Applied Biosystems /suporte@appliedbiosystems.com).

O modelo matemático utilizado neste estudo para quantificação relativa de RT-PCR em tempo real permite quantificar a expressão relativa do gene alvo em comparação a um gene de referência (endógeno). A razão da expressão relativa (R) do gene alvo foi calculada com base na eficiência (E) e no ΔCt (Ct do controle (0h) - Ct da amostra analisada), tendo os dados de expressão do gene alvo normalizados em relação ao nível de expressão de gene de referência (endógeno) (PFAFFL, 2001).

$$R = \frac{(E_{\text{alvo}})^{\Delta Ct_{\text{alvo}}(\text{controle}-\text{amostra})}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta Ct_{\text{ref}}(\text{controle}-\text{amostra})}}$$

E_{alvo} = eficiência da transcrição do gene alvo

E_{ref} = eficiência da transcrição do gene de referência ou endógeno

Tabela 1. Informações referentes aos genes e suas sequências de iniciadores utilizados nas análises de qRT-PCR, obtidos junto ao banco de dados do RAP-DB (*Rice Annotation Project Database*), 2010.

Gene	Loco	Tipo	Função molecular	Componente celular	Sequências de iniciadores
<i>OsFRDL1</i>	Os03g0216700	mRNA	Transporte	Membrana	5'-TGCTGAAAAGACCAGGAAGACA-3' 5'-GTTGGCTCATTTCTTGGGCTAC-3'
<i>OsNRAMP1</i>	Os07g0257200	mRNA	Transporte	Membrana	5'-GGGCCCCATCTTGCTCTTAC-3' 5'-TACTGTCCTTCGAGCTGCCG-3'
<i>OsNRAMP2</i>	Os03g0208500	mRNA	Transporte	Membrana	5'-TCAACCGAAGATTAAGGAAGCC-3' 5'-GCACATATGCAGGCCAATTTG-3'
<i>UBQ5</i>	Os01g0328450	mRNA	Constitutivo (gene conservado)		5'-ACCACTTCGACCGCCACTACT-3' 5'-ACGCCTAAGCCTGCTGGTT-3'

As reações de qRT-PCR foram realizadas em um equipamento modelo ABI RT-PCR 7500 (Applied Biosystems®) utilizando o sistema de detecção SYBR® Green (Applied Biosystems®, California, USA), a partir de: 2,0 µl de tampão 10x; 1,2 µl de MgCl₂ 50 mM; 0,4 µl de dNTPs 5 mM; 1 µl de cada oligonucleotídeo (10 µM); 0,05 µl de Platinum Taq - DNA polimerase (5 U/µl); 2 µl de SYBER green (1x); 0,4 µl de ROX, 1 µl da primeira fita de cDNA (diluída 1:5, selecionada com base nos resultados das análises de validação) e água para completar o volume final de 20 µl. As condições de ciclagem utilizadas para amplificação foram: 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos e 40 ciclos de 95°C por 30 segundos, 60°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto, ocorrendo a leitura da fluorescência neste último passo. Por último, um ciclo de 72°C por 5 minutos. Os produtos das reações foram analisados em gel de agarose 3% corado com brometo de etídeo, utilizando-se como padrão de tamanho de fragmento o marcador *Ladder* 100 pb.

Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado. Os dados foram analisados através de ferramentas do programa Mult Experiment Viewer (TIGR MeV) (SAEED et al., 2003), EASE Expression Analysis Systematic Explorer versão 4.6 de acordo com Hosack et al. (2003) e apresentados em forma de diagrama de cor. Os dados foram analisados quanto à sua homogeneidade de variância, posteriormente, submetidos à análise de variância ($P \leq 0,05$) e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$). A presença de correlações entre as variáveis dependentes do estudo foi analisada através do Coeficiente de Correlação de Pearson. Os agrupamentos obtidos com a Análise de Componentes Principais (ACP) foram construídos em função do comportamento das variáveis dependentes (SAS INSTITUTE, 2002).

6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados do experimento de validação são apresentados na tabela 2. A qualidade da curva padrão foi aferida a partir do *slope* da equação de regressão linear, utilizado para o cálculo da eficiência de amplificação, assim como do coeficiente de regressão (R^2) (DEPREZ et al., 2002).

Tabela 2. Resultados do experimento de validação dos genes *OsFRDL1*, *OsNRAMP1* e *OsNRAMP2* em relação ao padrão de referência *UBQ5*, realizada a partir de diluições seriadas de cDNA do genótipo BR-IRGA 410 no tempo 0h de exposição ao Fe^{2+} . FAEM/UFPel, 2010.

Tecido	Gene	Slope	Eficiência	Eficiência %	R ²
Parte aérea	<i>UBQ5</i>	-3.42	2.0	96	0.96
Parte aérea	<i>OsFRDL1</i>	-3.26	2.0	103	0.98
Parte aérea	<i>OsNRAMP2</i>	-2.91	2.2	121	0.99
Raiz	<i>UBQ5</i>	-3.52	1.9	92	0.99
Raiz	<i>OsNRAMP1</i>	-2.98	1.8	82	0.97
Raiz	<i>OsFRDL1</i>	-3.85	2.2	117	0.93

As eficiências mais ajustadas foram evidenciadas entre *UBQ5* (96%) e *OsFRDL1* (103%) na parte aérea e na raiz foram entre *UBQ5* (92%) e *OsNRAMP1* (82%). Os valores dos coeficientes de regressão (R²) foram todos superiores a 95% com exceção do *OsFRDL1* em raiz que apresentou um valor de 93%, indicando que os resultados obtidos para os genes *OsFRDL1* e *OsNRAMP2* na parte aérea assim como para *OsNRAMP1* na raiz apresentaram confiabilidade superior a 95% (Tabela 2).

Na figura 1 é apresentado o gráfico representativo da validação experimental, construído com base nos valores de ΔCt em comparação ao logaritmo das diluições do cDNA das amostras, normalizando a amplificação do gene alvo e do endógeno. Quando a eficiência de amplificação do gene alvo e do endógeno forem semelhantes, o valor de *slope* da equação obtida deverá estar entre -0,1 e 0,1 (Applied Biosystems /suporte@appliedbiosystems.com). Este resultado foi observado no experimento de validação realizado para os genes *OsFRDL1* (parte aérea) apresentando um valor de *slope* de -0,19 (A); *OsNRAMP1* (raiz) de -0,12 (B); *OsNRAMP2* (parte aérea) de -0,12 (C) e *OsFRDL1* (raiz) de -0,07 (D), indicando que a quantificação relativa pode ser realizada neste estudo, pois os valores estão ajustados.

O nível de expressão dos genes *OsFRDL1* e *OsNRAMP2* na parte aérea foi analisado em relação ao nível de expressão de uma amostra controle coletada de tecido de parte aérea no tempo de 0h de exposição ao estresse por ferro.

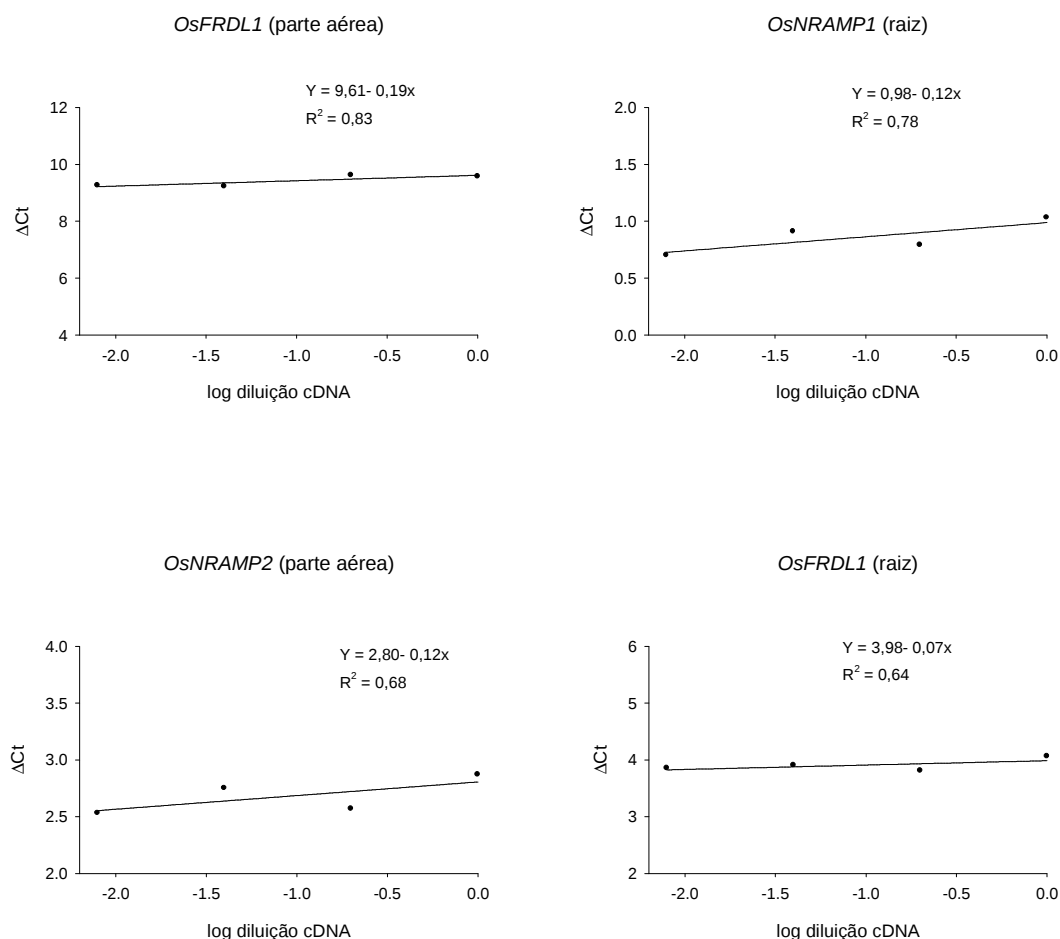


Figura 1. Regressões ajustadas para a variável dependente ΔC_t (C_t do gene alvo - C_t do gene de referência, *UBQ5*) em relação ao logaritmo das diluições de cDNA de raiz e parte aérea, do genótipo controle BR-IRGA 410, no tempo 0h de exposição ao Fe^{2+} , analisadas em qRT-PCR em tempo real. FAEM/UFPeI, 2010.

Para os genes *OsNRAMP1* e *OsFRDL1* em raiz, foi utilizada uma amostra de tecido de raiz. Por definição o nível de expressão destas amostras foi igualado a um e as demais amostras foram comparadas a elas. Na figura 2, pode ser observado o perfil de expressão dos genes *OsFDRL1* (parte aérea e raiz), *OsNRAMP1* (em raiz) e *OsNRAMP2* (parte aérea).

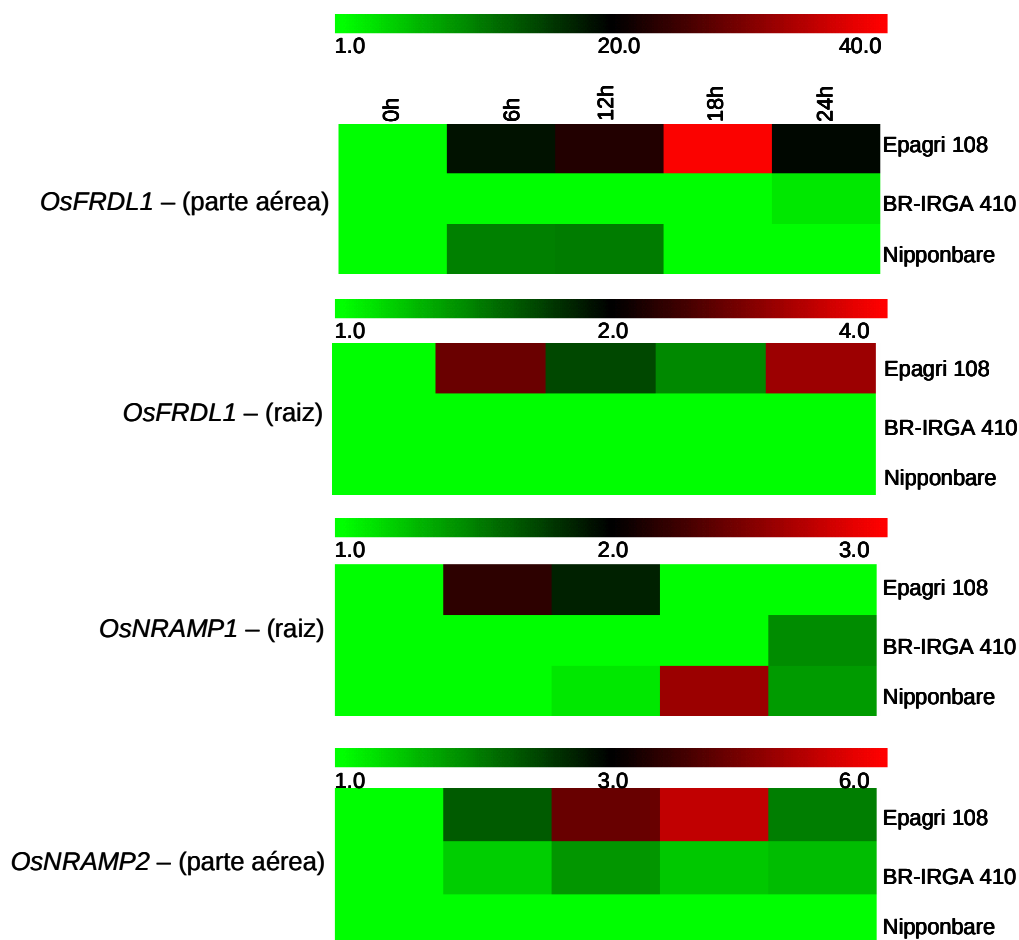


Figura 2. Perfis de expressão dos genes *OsFRDL1* (em parte aérea e raiz), *OsNRAMP1* (em raiz) e *OsNRAMP2* (em parte aérea), analisados em cinco tempos de exposição ao estresse por Fe^{2+} (0; 6; 12, 18 e 24 horas), em três genótipos de arroz irrigado (Epagri 108, BR-IRGA 410 e Nipponbare), através da técnica de qRT-PCR e representado por uma escala de 1 - 40, utilizando o *Mult Experiment Viewer* (TIGR MeV) (SAEED et al., 2003). Uma extremidade da escala representada pela cor verde claro indica o menor nível de expressão do gene e a outra extremidade representada pela cor vermelha claro indica o maior nível de expressão. FAEM/UFPeI, 2010.

O gene *OsFRDL1* (parte aérea) no genótipo Epagri 108, considerado tolerante a toxidez por ferro, apresentou um aumento de expressão de 18,5 vezes na análise de 6h sob estresse por Fe^{2+} , 23 vezes em 12h, 40 vezes em 18h e reduziu para 20 vezes em 24h. Apresenta, portanto, seu pico de expressão na análise de 18h sob estresse por ferro. No genótipo BR-IRGA 410 o *OsFRDL1* (parte aérea) apresentou um aumento significativo na sua expressão, de 2,6 vezes, apenas na análise de 24h. Nas análises anteriores não foi detectada expressão superior ao controle, demonstrando que neste genótipo, considerado sensível a toxidez por ferro, o gene *OsFRDL1* começa a se expressar apenas a partir de 24h sob estresse por ferro. O genótipo Nipponbare, que se mostrou sensível a toxidez por ferro em condições hidropônicas conforme dados apresentados no capítulo anterior, apresentou um aumento na expressão do gene *OsFRDL1* de 10,4 vezes na análise de 6h, aumentando para 10,7 na de 12h e posteriormente reduzindo a valores inferiores ao controle nas análises de 18 e 24h. Este genótipo, portanto, apresentou uma elevação no nível de expressão do gene *OsFRDL1* nas primeiras 12h sob estresse por ferro e no restante dos períodos de avaliação, este gene parece ter sido desativado, não sendo mais evidenciada nenhuma expressão.

O perfil de expressão do gene *OsFRDL1* (raiz) também é demonstrado na figura 2. Sendo evidenciado no genótipo Epagri 108 um aumento no nível de expressão do gene de 3 vezes na análise de 6h, 1,7 em 12h, 1,5 em 18h e 3,3 vezes em 24h. Nos genótipos BR-IRGA 410 e Nipponbare não foi detectado nenhum aumento no nível de expressão do gene *OsFRDL1* na raiz em relação ao controle.

Como pôde ser evidenciado neste estudo, os níveis de expressão do gene *OsFRDL1* foram mais elevados em parte aérea do que em raiz, em condições de excesso de Fe. No entanto o gene apresentou aumento de expressão tanto em parte aérea quanto em raiz no genótipo tolerante a toxidez por ferro (Epagri 108).

Inoue et al. (2004) já haviam caracterizado os genes *OsFRDL1*, *OsFRDL2* e *OsFRDL3* em raízes de plantas de arroz em condições de suficiência e deficiência de Fe. Os autores evidenciaram que *OsFRDL1* apresentava baixa expressão nas raízes em condições suficiência de Fe e tinha a expressão ligeiramente induzida em condição de deficiência. O gene *OsFRDL1* foi localizado nas células envolvidas no transporte de Fe a longa distância, em ambas as condições. Além disso, a expressão *OsFRDL1* foi observada durante a fase reprodutiva. De acordo com estes

resultados, os autores sugerem que *OsFRDL1* é um transportador que reside na membrana plasmática das células envolvidas no transporte a longa distância.

Sendo o gene *OsFRDL1* um transportador de membrana plasmática envolvido no transporte de Fe a longa distância (INOUE et al., 2004) é compreensível que este apresente aumento do nível de expressão tanto em raízes quanto em parte aérea sob condições de excesso de Fe. No entanto o comportamento diferenciado do gene nos diferentes genótipos analisados demonstra que genótipos tolerantes e sensíveis apresentam mecanismos diferenciados de resposta a condição de excesso de ferro. Pois no genótipo tolerante o gene se demonstrou bem mais ativo, tanto em parte aérea quanto em raiz.

Colares (2009), estudando a expressão do gene *OsFRDL1* em genótipos de arroz contrastantes quanto à tolerância ao alumínio, verificou que a cultivar tolerante ao metal apresentou nível de expressão do gene, superior ao da cultivar sensível, sugerindo que a secreção de citrato possa atuar como um mecanismo de tolerância do arroz ao efeito tóxico do alumínio. O gene *OsFRDL1*, portanto, apresenta expressão diferencial em genótipos contrastantes quanto a tolerância ao alumínio. Fato semelhante ao evidenciado neste estudo. No genótipo tolerante a toxidez por Fe o nível de expressão do gene *OsFRDL1* foi superior a do genótipo sensível na parte aérea e na raiz foi detectada expressão deste gene apenas no genótipo tolerante.

O gene *OsNRAMP1* avaliado em raiz apresentou aumento no nível de expressão nos três genótipos avaliados, assim como o gene *OsFRDL1* em parte aérea. No genótipo Epagri 108 o *OsNRAMP1* apresentou um aumento de expressão na análise de 6h de 2,2 vezes e em 12h de 1,8 vezes. Não foi detectado aumento nas análises de 18 e 24h. No BR-IRGA 410 foi verificado aumento apenas na análise de 24h que foi de 1,5 vezes, demonstrando que a atividade do gene *OsNRAMP1* neste genótipo inicia-se apenas após 24h de exposição ao estresse por Fe^{2+} . No genótipo Nipponbare nas análises de 12, 18 e 24 horas foram verificados aumentos no nível de expressão *OsNRAMP1* na ordem de 1; 2,6 e 1,4 vezes respectivamente (Figura 2).

De acordo com Curie et al. (2000), o gene *OsNRAMP1* é preferencialmente expresso em raízes, em condições de deficiência de Fe. Thomine et al. (2000), evidenciaram o aumento de expressão do *OsNRAMP1* em condições de deficiência

de ferro, relacionando o gene a absorção de Fe do solo e sugerem que esteja envolvido na remobilização do Fe para o citosol sob condições de deficiência do mesmo. Neste estudo podemos constatar que *OsNRAMP1* tem sua expressão induzida em raízes sob condição de excesso de Fe. A indução de expressão do *OsNRAMP1* nos genótipos sensíveis a toxidez por ferro, necessita que estes genótipos permaneçam mais tempo sob condição de estresse do que o genótipo tolerante, o qual apresentou o maior nível de expressão na avaliação de 6h sob estresse, enquanto que Nipponbare apenas a partir de 12h e BR-IRGA 410 a partir de 24h.

Na figura 2 também é demonstrado o comportamento do gene *OsNRAMP2* (parte aérea) que apresentou aumento no nível de expressão nas análises realizadas com os genótipos Epagri 108 e BR-IRGA 410. Sendo que no genótipo tolerante a toxidez por Fe^{2+} Epagri 108, o aumento foi bem mais acentuado, representando 2,3 vezes na análise de 6h e 4,3; 5,3 e 2 vezes nas análises de 12, 18 e 24 horas, respectivamente. Portanto o gene *OsNRAMP2* apresentou aumento sucessivo de expressão nas análises de 6, 12 e 18 horas e após este período apresentou uma redução. Já no genótipo BR-IRGA 410 o perfil de expressão deste gene foi distinto do apresentado no Epagri 108, apresentando um padrão de expressão bastante uniforme durante as avaliações, sendo detectadas variações bem sutis, 1,4; 1,8; 1,4 e 1,5 vezes em 6; 12; 18 e 24 horas, respectivamente. BR-IRGA 410, portanto, apresentou aumento na expressão do *OsNRAMP2* em relação ao controle, tempo 0h, no entanto manteve um perfil de expressão uniforme em relação ao aumento do tempo de estresse. No genótipo Nipponbare não foi detectada alteração na expressão do gene *OsNRAMP2* em nenhum dos tempos de avaliação. Este gene, portanto, não respondeu ao estresse por ferro no genótipo Nipponbare.

O gene *OsNRAMP2* é preferencialmente expresso em folhas sob condição de deficiência de Fe (CURIE et al., 2000). Sob condição de excesso de Fe o *OsNRAMP2* teve sua expressão induzida em folhas nos genótipos Epagri 180 e BR-IRGA 410, ambos pertencentes a subespécie *indica*, enquanto que no genótipo Nipponbare subespécie *japônica*, nenhuma indução foi detectada.

Através da Análise de Correlação de Pearson (Tabela 3) foi evidenciado que os dados obtidos no estudo apresentam correlação. As variáveis expressão do gene *OsFRDL1* e *OsNRAMP2* (parte aérea) foram as que evidenciaram o maior

coeficiente de correlação positiva significativa (0,70), representando que, quando ocorreu um aumento de expressão do gene *OsFRDL1* (parte aérea), também foi verificado um aumento na expressão do gene *OsNRAMP2* no mesmo tecido. Seguidas pelas variáveis expressão do gene *OsFRDL1* em raiz e *OsNRAMP2* em parte aérea, que apresentaram o segundo maior coeficiente de correlação positiva significativa (0,42). De acordo com esses resultados, verificamos que os genes *OsFRDL1* e *OsNRAMP2* apresentam correlação.

Tabela 3. Coeficiente de Correlação de Pearson entre as variáveis: *OsFRDL1*, *OsNRAMP1* e *OsNRAMP2*, considerando três genótipos de arroz irrigado (Epagri 108, BR-IRGA 410 e Nipponbare), avaliados em cinco tempos de exposição ao estresse por Fe^{2+} (0; 6; 12, 18 e 24 horas), através da análise de qRT-PCR em tempo real. FAEM/UFPel-CGF, 2010.

Variáveis	<i>OsFRDL1</i> (PA)	<i>OsFRDL1</i> (R)	<i>OsNRAMP1</i> (R)	<i>OsNRAMP2</i> (PA)
<i>OsFRDL1</i> (PA)	1	0,18	0,38*	0,70*
<i>OsFRDL1</i> (R)		1	0,34	0,42*
<i>OsNRAMP1</i> (R)			1	0,30
<i>OsNRAMP2</i> (PA)				1

Tecidos analisados: PA= parte aérea; R= raiz; * Significante ao nível de 0.05 de probabilidade.

Não foi evidenciada correlação negativa significativa, entre nenhuma das variáveis, indicando que o incremento na expressão de qualquer um dos genes analisados não acarreta em decréscimo na expressão de qualquer um dos outros genes avaliados.

Após a comprovação de correlação entre as variáveis analisadas, foi realizada uma Análise de Componentes Principais (ACP), com base em uma matriz de correlação, sendo os agrupamentos construídos em função do comportamento das variáveis dependentes do estudo: expressão de *OsFRDL1* (parte aérea), *OsFRDL1* (raiz), *OsNRAMP1* (raiz) e *OsNRAMP2* (parte aérea). Esse método provê um modo objetivo de encontrar índices que forneçam um bom resumo para o conjunto de variáveis analisadas de modo que a variação relevante dos dados seja levada em consideração.

A ACP foi utilizada por Tsuwamoto et al. (2007) no estudo da expressão diferencial de genes envolvidos no processo de indução da embriogênese de micrósporos de *Brassica napus* através da análise de Real-time RT-PCR.

Da Análise de Componentes Principais (ACP) resultam os autovetores que representam a variabilidade espacial dos dados em uma matriz. Os autovetores são fatores de ponderação que definem a contribuição de cada banda original para uma componente principal, numa combinação aditiva e linear. Dessa forma, podemos afirmar que o fator de maior contribuição para diferenciação dos genótipos e formação do agrupamento correspondente ao CP 2 foi o gene *OsNRAMP1* avaliado em raiz (0,98).

Os genes *OsFRDL1* e *OsNRAMP2* avaliados em parte aérea tiveram uma contribuição de 0,62 e 0,60 respectivamente, na formação do agrupamento correspondente ao CP 1 e *OsFRDL1* avaliado em raiz contribuiu com 0,50 na constituição do mesmo grupo (Tabela 4).

Tabela 4. Autovetores correspondentes aos dois componentes principais (CP 1 e CP 2) para as variáveis: *OsFRDL1*, *OsNRAMP1* e *OsNRAMP2*, considerando três genótipos de arroz irrigado (Epagri 108, BR-IRGA 410 e Nipponbare), avaliados em cinco tempos de exposição ao estresse por Fe^{2+} (0; 6; 12, 18 e 24 horas), através da análise de qRT-PCR em tempo real. FAEM/UFPel-CGF, 2010.

Variáveis	CP 1	CP 2
<i>OsFRDL1</i> (PA)	0,62	0,10
<i>OsFRDL1</i> (R)	0,50	0,07
<i>OsNRAMP1</i> (R)	0,11	0,98
<i>OsNRAMP2</i> (PA)	0,60	0,14

Tecidos analisados: PA= parte aérea; R= raiz; * Significante ao nível de 0.05 de probabilidade; CP 1= componente principal um e CP 2= componente principal dois.

A dispersão gráfica, utilizando-se os dois primeiros componentes principais (CP1 e CP2) para as variáveis dependentes (*OsNRAMP1*, *OsNRAMP2* e *OsFRDL1*), demonstra a diferenciação entre os genótipos. O genótipo tolerante a toxidez por ferro EPAGRI 108 (G1), agrupou independentemente dos demais, enquanto que os genótipos sensíveis BR IRGA 410 (G2) e Nipponbare (G3) constituíram outro grupo. Os dois primeiros componentes principais (duas distribuições de dados) explicaram 82% da variabilidade total, CP1 (57%) e CP2 (25%), como demonstrado através do gráfico de dispersão (Figura 3).

Através da análise de *qRT-PCR* em tempo real dos genes *OsNRAMP1*, *OsNRAMP2* e *OsFRDL1*, foi possível diferenciar genótipos tolerantes e sensíveis a toxidez por ferro, pois estes genes apresentam expressão diferencial nestas constituições genéticas sob condições de estresse por ferro.

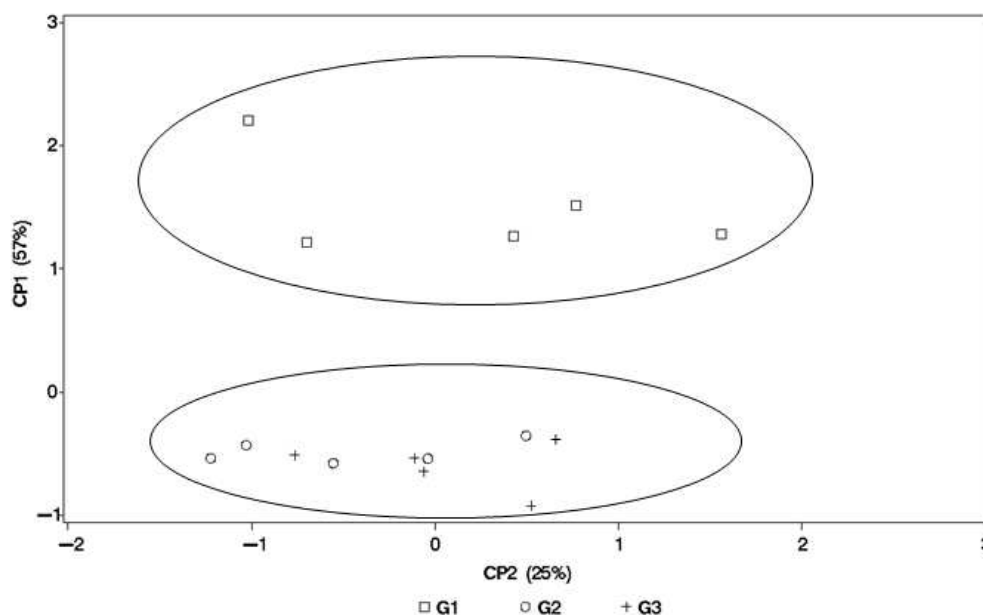


Figura 3. Dispersão gráfica dos genótipos Epagri 108 (G1), BR-IRGA 410 (G2) e Nipponbare (G3), utilizando-se os dois primeiros componentes principais (CP1 e CP2) para variáveis dependentes (*OsNRAMP1*, *OsNRAMP2* e *OsFRDL1*), com base em análises de expressão de *qRT-PCR*. FAEM/UFPel, 2010.

6.4 CONCLUSÕES

Constituições genéticas contrastantes quanto a tolerância a toxidez por ferro apresentam expressão diferencial dos genes *OsFRDL1*, *OsNRAMP1* e *OsNRAMP2* envolvidos na homeostase do metal.

O gene *OsFRDL1*, foi o que evidenciou maior expressão sob a condição de estresse por ferro.

6.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

APPLIED BIOSYSTEMS. suporte@appliedbiosystems.com.

ASCH, F.; BECKER, M.; KPONGOR, D. S. A quick and efficient screen for resistance to iron toxicity in lowland rice, **J. Plant Nutr. Soil Sci.** v.168, n.6, p.764-773, 2005.

BELOUCHI, A.; KWAN, T.; GROS, P. Cloning and characterization of OsNramp family from *Oryza sativa*, a new family of membrane proteins possibly implicated in the transport of metal ions. **Plant Molecular Biology.** v.33, p.1085-1092. 1997.

BRASIL. Ministério da Agricultura e da Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes.** Brasília, DF: SNDA/DNDV/CLAV. 365p, 1992.

CATALDO, D.A.; MCFADDEN, K.M.; GARLAND, T. R.; WILLDUNG, R.E. Organic constituents and complexation of nickel (II), iron (III), cadmium (II), and plutonium (IV) in soybean xylem exudates. **Plant Physiology.** v.86, p.734–39. 1988.

CELLIER, M. F. M.; BERGEVIN, I.; BOYER, E.; RICHER, E. Polyphyletic origins of bacterial Nramp transporters. **Trends in Genetics.** v.17, n.7, p.365-370. 2001.

COLANGELO, E. P.; GUERINOT, M. L. Put the metal to the petal: metal uptake and transport throughout plants. **Plant Biol.** v.9, p. 322 e 330. 2006.

COLARES, D. S. **Caracterização de cultivares de arroz (*Oryza sativa* L.) quanto ao estresse por alumínio e análise da expressão do gene *OsFRDL1*.** Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2009.

CURIE, C.; ALONSO, J.M.; JEAN, M.L.; ECKER, J.R.; BRIAT, J.F. Involvement of NRAMP1 from *Arabidopsis thaliana* in iron transport. **Biochemical Journal.** v.347, p.749-755. 2000.

CURIE, C.; BRIAT, J.F. Iron transport and signaling in plants. **Annu. Rev. Plant Biol.** v.54, p.183–206. 2003.

DEPREZ, R.H.L. Sensitivity and accuracy of quantitative real-time polymerase chain reaction using SYBR green I depends on cDNA synthesis conditions. **Analytical Biochemistry**. v.307, p. 63-69, 2002.

DOBERMANN, A.; FAIRHURST, T. Rice: Nutrient disorders and nutrient management. **The International Rice Research Institute**, Manila, Philippines.2000.

DURRET, T. P.; GASSMANN. W.; ROGERS, E. E. The FRD3-mediated Efflux of Citrate into the Root Vasculature is Necessary for Efficient Iron Translocation. **Plant Physiology**. v.144, p.197–205. 2007.

FUJITA, M.; FUJITA, Y.; NOUTOSHI, Y.; TAKAHASHI, F.; NARUAKA, Y.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks. **Current Opinion in Plant Biology**. v.9, n.4, p.436-442. 2006.

GREEN, L. S.; ROGERS, E. E. FRD3 Controls Iron Localization in Arabidopsis. **Plant Physiology**. v.136, p.2523-2531, 2004.

GROSS, J.; STEIN, R.J.; FETT-NETO, A.G.; FETT, J.P. Iron homeostasis related genes in rice. **Genetics and Molecular Biology**. v.26. n.4, p.477-497. 2003.

GRUSAK, M.A. Enhancing mineral content in plant food products. **Journal of the American College of Nutrition**. v. 21, p.178S-183S. 2002.

HE, G-X.; KURODA, T.; MIMA, T.; MORITA, Y.; MIZUSHIMA, T.; TSUCHIYA, T. An H⁺-coupled multidrug efflux pump, PmpM, a member of the MATE family transporters, from *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Bacteriology**. v.186,p. 262-265, 2004.

HOSACK, D. A.; DENNIS, G. JR.; SHERMAN, B.T.; LANE, H.C.; LEMPICKI, R.A. Identifying biological themes within lists of genes with EASE. **Genome Biology**, v.4, R70, 2003.

INOUE, H.; MIZUNO, D.; TAKAHASHI, M.; NAKANISHI, H.; MORI, S.; NISHIZAWA, N. K. A Rice FRD3-Like (OsFRDL1) Gene Is Expressed in the Cells Involved in Long-Distance Transport. **Soil Sci Plant Nutr**. v.50, n. 7, p. 1133-1140, 2004.

INTERNATIONAL BRACHYPODIUM INITIATIVE (BII). Genome sequencing and analysis of the model grass Brachypodium distachyon. **Nature**. v.463, n.08747, p.763-768, 2010.

INTERNATIONAL RICE GENOME SEQUENCING PROJECT (IRGSP). The map-based sequence of the rice genome. **Nature**. v.1, n.7052, p.793-800, 2005.

JAIN, M.; NIJHAWAN, A.; TYAGI, A. K.; KHURANA, J. P. Validation of housekeeping genes as internal control for studying gene expression in rice by quantitative real-time PCR. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 345, p. 646–651. 2006.

MeV+R Supplementary Web Site [<http://expression.washington.edu/mevr/>]

NARAYANAN, N. N.; VASCONCELOS, W.M.; GRUSAK, A.M. Expression profiling de *Oryza sativa* metal homeostasis genes in different rice cultivars using a cDNA macroarray. **Plant Physiology and Biochemistry**. v.45, p.277-286. 2007.

NCBI Taxonomy: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/> - acessado em 15 de março de 2010.

NEVO, Y.; NELSON, N. The mutation F227I increases the coupling of metal ion transport in DCT1, **J. Biol. Chem.** v.27951, p.53056–53061. 2004.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**. v.29, n. 9, p.2002-2007, 2001.

RAP-DB (*Rice Annotation Project Database*) http://rapdb.dna.affrc.go.jp/gbrowse_details/build5?name

RASMUSSEN, R. Quantification on the lightcycler. IN MEUER, S.; WITTEWERT, C.; NAKAGAWARA, K. (eds), *Rapid Cycle Real-time PCR*, **Methods and Applications Springer Press**. Heidelberg, p. 21–34. 2001.

SAEED, A.I.; SHAROV, V.; WHITE, J.; LI, J.; LIANG, W.; BHAGABATI, N.; BRAISTED, J.; KLAPA, M.; CURRIER, T.; THIAGARAJAN, M.; STURN, A.; SNUFFIN, M.; REZANTSEV, A.; POPOV, D.; RYLTSOV, A.; KOSTUKOVICH, E.; BORISOVSKY, I.; LIU, Z.; VINSAVICH, A.; TRUSH, V.; QUACKENBUSH, J. TM4: A free, open-source system for microarray data management and analysis. **Biotechniques**. v. 34, 374. 2003.

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM. **SAS: Statistical Analysis System-Getting Started with the SAS Learning Edition**. Cary, NC: SAS Institute Inc., 2002. 86p.

TAIZ, L., ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

THOMINE, S.; WANG, R.; WARD, J.M.; CRAWFORD, N.M.; SCHROEDER, J.I. Cadmium and iron transport by members of a plant metal transporter family in *Arabidopsis* with homology to Nramp genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v.97, p.4991-4996. 2000.

TSUWAMOTO, R.; FUKUOKA, H.; TAKAHATA, Y. Identification and characterization of genes expressed in early embryogenesis from microspores of *Brassica napus*. **Planta**. v.225, p.641–652, 2007.

YOKOSHO, K.; YAMAJI, Y.; 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.

YOSHIDA, S.; FORNO, D. A.; COCK, J. H.; GOMEZ, K. A. **Laboratory Manual for Physiological Studies of Rice.** The international rice research institute (IRRI). Los Baños, Laguna, Philippines. 1976.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Constatamos que a utilização do Fe-EDTA não melhora a absorção de Fe pelas plantas como era esperado, ao contrário, reduz. Também verificamos que o sistema hidropônico demonstra eficiência na caracterização dos genótipos quanto a tolerância a toxidez por ferro.

O fator tempo de exposição a toxidez por ferro apresentou efeito significativo sobre o crescimento de plântulas de arroz em cultivo hidropônico de maneira diferencial para os genótipos testados. O aumento do tempo de estresse resulta no incremento do acúmulo de ferro na parte aérea das plântulas. Tanto genótipos tolerantes quanto sensíveis acumulam elevados teores de Fe na parte aérea.

Também foi possível verificar que a toxidez por excesso de ferro interfere negativamente sobre o desenvolvimento do CR e CPA, sendo o CR a variável mais afetada.

Os genótipos caracterizados, como sensíveis a toxidez por ferro neste estudo, BR-IRGA 409 e Nipponbare, também foram os que apresentaram o maior acúmulo de Fe^{2+} na parte aérea. E o aumento do acúmulo de Fe^{2+} nos tecidos sob condição de excesso do íon na solução apresenta correlação com o aumento Zn e Mn nestes mesmos tecidos.

Por fim verificamos que as constituições genéticas contrastantes quanto a tolerância a toxidez por ferro apresentam expressão diferencial dos genes *OsFRDL1*, *OsNRAMP1* e *OsNRAMP2* envolvidos na homeostase do metal. E o gene *OsFRDL1*, foi o que evidenciou maior expressão sob a condição de estresse por ferro.

Estes resultados poderão ser empregados como ferramenta para os programas de melhoramento genético do arroz visando o desenvolvimento de linhagens mais adaptadas e com maior potencial de cultivo em solos de várzea. Assim como, a identificação de genes diferencialmente expressos sob condição de estresse por ferro contribuirá para a elucidação dos mecanismos moleculares envolvidos na homeostase do metal.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ITEM 1

AKBAR, M.; GUNAWARDENA, I.; PONNAMPERUMA, N. Breeding for soil stresses: **Progress in rainfed lowland rice**. IRRI, Los Banos, The Philippines. p.263–272.1987.

AUDEBERT, A.; FOFANA, M. Rice Yield Gap due to Iron Toxicity in West Africa, **J. Agron. Crop Sci.** v.195, n.1, p.66-76, 2009.

BACHA, R. Avaliação de linhagens e cultivares de arroz irrigado para condições adversas de solo: toxidez por ferro. 19, 1993. In: Reunião da Cultura do Arroz Irrigado, Balneário Camburiú. **Anais**. Florianópolis: EMPASC, 1993.p.156-159.

BECANA M.; MORAN J.F.; ITURBE-ORMAETXE I. Iron-dependent oxygen free radical generation in plants subjected to environmental stress: Toxicity and antioxidant protection. **Plant and Soil**. v.201, p.137-147. 1998.

BECKER, M.; ASCH, F. Iron toxicity in rice-conditions and management concepts, **J. Plant Nutr. Soil Sci.** v.168, n.4, p.558-573. 2005.

BENCKISER, G., OTTOW, J. C. G., SANTIAGO, S., WATANABE, I. Physiochemical characterization of iron-toxic soils in some Asian countries. IRRI research paper series 85. **The International Rice Research Institute**, Los Banos, The Philippines.1982.

BENNETT, J. Status of breeding for tolerance of abiotic stresses and prospects for use of molecular techniques. TAC Secretariat, **Food and Agriculture Organization-FAO**, Rome. 2001.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Departamento Nacional de Pesquisa Agropecuária. Divisão de Pesquisa Pedológica. **Levantamento de reconhecimento dos solos do Estado do Rio Grande do Sul**. Recife. 341p. (Boletim Técnico, 30), 1973.

COLANGELO, E. P.; GUERINOT, M. L. Put the metal to the petal: metal uptake and transport throughout plants. **Plant Biol.** v.9, p. 322 e 330. 2006.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Disponível em. < www.conab.gov.br>. Acesso em 10/03/2010.

CRESTANI, M.; SOUZA, V.Q.; SILVA, J. A. G.; HARTWIG, I.; LUCHE, H. S. de; SOUSA, R. O de.; CARVALHO, F. F. I. de. Comportamento de genótipos de arroz irrigado submetidos ao estresse por ferro em condições de hidroponia. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**. v. 9, p.85-93, 2009.

DOBERMANN, A.; FAIRHURST, T. Rice: Nutrient disorders and nutrient management. **The International Rice Research Institute**, Manila, Philippines.2000.

FAGERIA N.K.; SLATON N.A.; BALIGAR V.C. Nutrient management for improving lowland rice productivity and sustainability. **Advances in Agronomy**. v.80, p.63–152. 2003.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations Statistical Database, disponível em <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx>, acessado em 20 de março de 2010.

GROSS, J.; STEIN, R.J.; FETT-NETO, A.G.; FETT, J.P. Iron homeostasis related genes in rice. **Genetics and Molecular Biology**. v.26. n.4, p.477-497. 2003.

GRUSAK, M.A. Enhancing mineral content in plant food products. **Journal of the American College of Nutrition**. v. 21, p.178S-183S. 2002.

GUNAWARDENA, I.; VIRMANI, S. S.; SUMO, F. J. Breeding rice for tolerance to iron toxicity. *Oryza* 19, 5–12. Gupta, A. S., Webb, R. P., Holaday, A. S., Allen, R. D. Overexpression of superoxide dismutase protects plants from oxidative stress. **Plant Physiol**. v.103, p.1067–1073.1982.

INSTITUTO RIO-GRANDENSE DO ARROZ (IRGA). **Arroz irrigado no RS**: área cultivada, produção, nº de engenhos e beneficiamento. Disponível em: <http://www.irga.rs.gov.br>. Acesso em: 2004.

MAGALHÃES JR, A. M de; FAGUNDES, P. R. R; GOMES, A.S; FRANCO, D. F.; SEVERO, A. Seleção de linhagens de arroz irrigado do programa de melhoramento da Embrapa à toxicidade por ferro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ARROZ IRRIGADO, 4 ; REUNIÃO DA CULTURA DO ARROZ IRRIGADO, 26, 2005, Santa Maria. **Anais**. Santa Maria: UFSM, 2005. p. 204-206.

MAGALHÃES JR, A. M de; FAGUNDES, P. R. R; GOMES, A.S; FRANCO, D. F.; SEVERO, A. Avaliação de linhagens de arroz irrigado à toxicidade por ferro do programa de melhoramento da Embrapa. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ARROZ IRRIGADO, 5 ; REUNIÃO DA CULTURA DO ARROZ IRRIGADO, 27, 2007, Pelotas. **Anais**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2007. p. 108-111.

MAHADEVAPPA, M.; BULBULE, A. V.; SIDDARAMAPPA, R.; KULKARNI, R. S. Field screening of rice cultivars for growth, yield and nutrient uptake in acidic soil. **Plant Soil Sci**. v.45, p.959–965.1991.

SAHRAWAT, K. L. Iron toxicity in wetland rice and the role of other nutrients. **Journal Plant Nutr**. v..27, p.1471-1504, 2004.

SAHRAWAT, K. L.; DIATTA, S. Nutrient management and season affect soil iron toxicity, in West Africa Rice Development Association: **Annual Report 1995**, p. 34–35.1996.

SHIMIZU, H.; SATO, K.; BERBERICH, T.; MIYAZAKI, A.; OZAKI, R.; IMAI, R.; KUSANO, T. LIP19, a basic region leucine zipper protein, is a Fos-like molecular switch in the cold signaling of rice plants. **Plant Cell Physiol.** v.46, p.1623–1634. 2005.

VAHL, L.C. **Toxidez de ferro em genótipos de arroz irrigado por alagamento**. Porto Alegre. Tese (Doutorado em Ciência do Solo), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1991.

WARDA. Annual Report 2000. West Africa Rice Development Association, Bouake, Côte d'Ivoire. 2001.

WISSUWA, M. Combining a modeling with a genetic approach in establishing associations between genetic and physiological effects in relation to phosphorus uptake. **Plant and Soil.** v.269, n.1/2, p.57-68. 2005.

WU, P.; HU, B.; LIAO, C.Y.; ZHU, J.M.; WU, Y.R.; SENADHIRA, D.; PATERSON, A.H. Characterization of tissue tolerance to iron by molecular markers in different lines of rice. **Plant and Soil.** v.203, p.217–226. 1998.

9. VITAE

Adriana Pires Soares Bresolin, nascida em 27/03/1974 em Porto Alegre/RS. Ingressou na Faculdade de Agronomia "Eliseu Maciel" (FAEM), da Universidade Federal de Pelotas (UFPel) em março de 1995. Foi bolsista de iniciação científica (CNPq) e monitora da disciplina de genética vegetal, no período de abril 1996 a fevereiro de 1998. No ano de 2004, iniciou estágio no Centro de Genômica e Fitomelhoramento recebendo treinamento em Técnicas Moleculares Aplicadas ao Melhoramento Vegetal, participando de vários congressos e reuniões técnicas de pesquisa. Em março de 2005, iniciou o mestrado no Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Fitomelhoramento, sob orientação da Dr^a. Caroline Marques Castro pesquisadora da Embrapa Clima Temperado e co-orientação do professor PhD. Antonio Costa de Oliveira da Universidade Federal de Pelotas, concluindo em 2007. No mesmo ano, ingressou no doutorado em fitomelhoramento, sob orientação do prof. Antonio Costa de Oliveira, concluindo o curso em novembro de 2010.