

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**  
**Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel**  
**Programa de Pós-Graduação em Agronomia**  
**Área de Concentração - Fitomelhoramento**



**Dissertação**

**CARACTERIZAÇÃO DE FAMÍLIASMUTANTES DE ARROZ (*Oryza sativa* L.)  
IRRIGADO PARA TOLERÂNCIA A TOXIDEZ DIRETA AO EXCESSO DE FERRO  
EM HIDROPONIA**

**Diana Marcela Hernández Hernández**

**Pelotas, 2021**

**CARACTERIZAÇÃO DE FAMÍLIAS MUTANTES DE ARROZ (*Oryza sativa* L.)  
IRRIGADO PARA TOLERÂNCIA A TOXIDEX DIRETA AO EXCESSO DE FERRO  
EM HIDROPONIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial a obtenção do título de mestre em Ciências (Área de concentração em Fitomelhoramento).

**Orientador:** *Ph.D.* Antonio Costa de Oliveira

**Co-orientadores:** Dr<sup>a</sup>. Viviane Kopp da Luz

Dr. Eduardo Venske

Dr<sup>a</sup>. Camila Pegoraro

**Pelotas, 2021**

**BANCA EXAMINADORA:**

Prof. *Ph.D.* Antonio Costa de Oliveira - Professor UFPel

Prof. Dr.<sup>a</sup> Adriana Pires Soares Bresolin –Professora da Universidade Federal do Pampa

Prof. Dr. Rogério Oliveira de Sousa Depto. Solos – Professor UFPel

Eng. Agr. Dr. Ariano Martins de Magalhães Júnior – Pesquisador da Embrapa Clima Temperado.

## Resumo

HERNANDEZ, Diana Marcela Hernández. **Caracterização de famílias mutantes de arroz (*Oryza sativa* L.) irrigado para tolerância a toxidez direta ao excesso de ferro em hidroponia.** 2021. 71f. Dissertação - Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Área de Concentração: Fitomelhoramento). Universidade Federal de Pelotas, Pelotas - RS, 2021.

O arroz (*Oryza sativa* L.) é a base alimentar de mais de três bilhões de pessoas, sendo considerado um dos alimentos mais importantes para a nutrição humana. Um dos fatores que podem prejudicar a produtividade da cultura sob o sistema irrigado, é a toxidez por ferro. Alguns de seus sintomas típicos são diminuição no comprimento e massa seca de parte aérea e raiz, manchas marrons nas folhas e danos à clorofila. O desenvolvimento inicial do arroz é também afetado sob o referido estresse. Uma técnica utilizada para incrementar a variabilidade genética para fins de melhoramento é a indução artificial de mutações. Diante do exposto, o objetivo do presente trabalho foi caracterizar um grupo de mutantes de arroz para a tolerância à toxidez por ferro no desenvolvimento inicial. As famílias mutantes se encontram na geração  $M_8$  e foram obtidas a partir da cultivar BRS Querência, via tratamento com Etilmetanosulfonato (EMS). Foram avaliadas, estas, em condição de hidroponia, após exposição ao estresse por ferro de  $400 \text{ mg L}^{-1}$  por 14 dias, para as variáveis comprimento de parte aérea e de raiz, massa seca de parte aérea e raiz, índice de clorofila "a" e "b" e mancha foliar. Foram identificadas três famílias mutantes superiores em sete variáveis em relação a cultivar BRS Querência, quanto a tolerância ao estresse por ferro. As análises de componentes principais (PCA) e agrupamento hierárquico demonstraram existir variabilidade genética na população mutante em sua resposta ao estresse por ferro. O grupo de linhagens se apresenta como promissor tanto sob o ponto de vista do melhoramento genético como para estudos genéticos mais aprofundados, inclusive de ordem molecular.

**Palavras-chave:** Estresse abiótico; Melhoramento vegetal; Triagem; Variabilidade genética.

## ABSTRACT

HERNANDEZ, Diana Marcela Hernández. **Characterization of mutant families of paddy rice (*Oryza sativa* L.) for tolerance of direct toxicity to iron excess in hydroponic culture.** 2021. 71f. Dissertation - Graduate Program in Agronomy (Area of Concentration: Plant Breeding). Federal University of Pelotas, Pelotas - RS, 2021.

Rice (*Oryza sativa* L.) is the staple food for more than three billion people, being considered one of the most important crop cereals for human nutrition. One of the factors that can impair the crop yield under the flooded-irrigated system is iron toxicity. Some of its common symptoms include decreased length and dry mass of shoots and roots, brown spots on leaves and damage to chlorophyll. The initial development of rice is also affected under this stress. A technique used to increase genetic variability for breeding purposes is the artificial induction of mutations. Given the above, the aim of the present work was to characterize a group of rice mutants for tolerance to iron toxicity at early development. The mutant families are in the M<sub>8</sub> generation and were obtained from the BRS Querência cultivar, via treatment with EMS. These lines were evaluated under hydroponic condition, after exposure to iron stress of 400 mg L<sup>-1</sup> for 14 days, for the variables shoot and root length, shoot and root dry mass, chlorophyll a and b index and leaf spots. Three mutant families, superior to BRS Querência for Fe tolerance for seven variables were identified, which represent promising tolerance sources for breeding programs. The analysis of principle components (PCA) and hierarchical clustering showed genetic variability for iron toxicity tolerance in the group of mutant families studied. The population is promising from the breeding point of view but also can serve as a reference for future studies for stress tolerance, and several molecular studies in rice.

**Key words:** Abiotic stress; Plant breeding; Screening; Genetic variability.

## Lista de tabelas

Tabela 1 – Cultivares de arroz que possuem algum nível de tolerância à toxidez por excesso de ferro.....	13
Tabela 2 – Solução de Yoshida modificada.....	26
Tabela 3 – Resumo da análise de variância para o desempenho relativo das variáveis comprimento de parte aérea (DR cpa), comprimento de raiz (DR cr), matéria seca de parte aérea (DR mspa), matéria seca de raiz (DR msr), índice de clorofila a (DR cla), índice de clorofila b (DR clb) e mancha foliar (DR mf) de 92 famílias mutantes M8 e as cultivares BRS Querência, BR IRGA 409 e Epagri 108. CGF/FAEM/UFPeI, 2021.....	28
Tabela 4 – Desempenho relativo da variável comprimento de parte aérea (DR cpa) de 92 famílias mutantes e as testemunhas BRS Querência, BR IRGA 409 e Epagri108.CGF/FAEM/UFPeI,2021.....	29
Tabela 5 – Desempenho relativo da variável comprimento de raiz (DR cr) de 92 famílias mutantes e as testemunhas BRS Querência, BR IRGA 409 e Epagri 108. CGF/FAEM/UFPeI,2021.....	30
Tabela 6 – Desempenho relativo da variável matéria seca de parte aérea (DR mspa) de 92 famílias mutantes e as testemunhas BRS Querência, BR IRGA 409 e Epagri 108. CGF/FAEM/UFPeI, 2021.....	31
Tabela 7 – Desempenho relativo da variável matéria seca de raiz (DR msr) de 92 famílias mutantes e as testemunhas BRS Querência, BR IRGA 409 e Epagri 108. CGF/FAEM/UFPeI, 2021.....	32
Tabela 8 – Desempenho relativo da variável índice de clorofila a (DR cla) de 92 famílias mutantes e as testemunhas BRS Querência, BR IRGA 409 e Epagri 108. CGF/FAEM/UFPeI, 2021.....	34
Tabela 9 – Desempenho relativo da variável índice de clorofila b (DR clb) de 92 famílias mutantes e as testemunhas BRS Querência, BR IRGA 409 e Epagri 108. CGF/FAEM/UFPeI, 2021.....	35
Tabela 10 – Desempenho relativo da variável mancha foliar (DR mf) de 92 famílias mutantes e as testemunhas BRS Querência, BR IRGA 409 e Epagri 108. CGF/FAEM/UFPeI, 2021.....	36
Tabela 11 - Associação dos componentes principais quanto às variáveis avaliadas no PCA. ....	52

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	7
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	10
2.1 Importância da cultura do arroz .....	10
2.2 Melhoramento vegetal para tolerância ao estresse por ferro .....	11
2.2.1 Características de cultivares brasileiras de arroz irrigado ao ferro.....	12
2.2.2 Mutações em arroz.....	13
2.3 Toxidez por ferro em arroz .....	15
2.4 Disponibilidade do ferro no solo. ....	16
2.5 Mecanismos de tolerância ao ferro .....	18
2.6 Sistema hidropônico .....	20
2.7 Análise multivariada para caracterização de variabilidade genética .....	20
<b>3. CAPÍTULO I. Caracterização de famílias mutantes de arroz (<i>Oryza Sativa</i> L.) irrigado para tolerância ao excesso de ferro</b> .....	23
3.1 Introdução .....	23
3.2 Material e métodos .....	24
3.2.1 Período e Localização do experimento .....	24
3.2.2 Grupo de mutantes .....	24
3.2.3 Condições experimentais .....	25
3.2.4 Avaliações fenotípicas .....	26
3.2.5 Delineamento experimental e Análises estatísticas .....	27
3.3 Resultados e discussão .....	27
3.4 Conclusões .....	38
<b>Referências</b> .....	38
<b>4. CAPÍTULO II. Variabilidade genética em famílias mutantes de arroz derivadas da cultivar BRS Querência</b> .....	47
4.1 Introdução .....	47
4.2 Material e métodos .....	49
4.3 Resultados e discussão .....	50
4.4 Conclusões .....	59
<b>5 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	59
<b>Referências</b> .....	60
<b>Apêndice</b> .....	63

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

O arroz (*Oryza sativa* L.) é a base alimentar de mais de três bilhões de pessoas, sendo considerado um dos alimentos mais importantes para a nutrição humana. Dentre os cereais, é o segundo mais cultivado no planeta. É consumido quase que exclusivamente por humanos e fornece 27% das calorias diárias para a população mundial (FAOSTAT, 2021). Apresenta o segundo maior volume de produção em grãos do mundo, sendo o Brasil, o nono maior produtor, apresentando uma área cultivada de 1,7 milhão de hectares e uma produtividade média de 6.266 kg ha<sup>-1</sup>, suprimindo praticamente por completo a demanda interna pelo cereal. O Estado do Rio Grande do Sul (RS) contribui com mais de 70% da produção brasileira, fato que apresenta grande relevância socioeconômica para o Estado e para o país, uma vez que a agricultura tem grande importância para a economia brasileira (CONAB, 2021). No RS, quase a totalidade da área orizícola é cultivada sob irrigação por inundação.

Desde o advento das cultivares modernas, do tipo moderno-filipino, no Rio Grande do Sul, a toxidez por ferro (Fe) apresenta-se como um grave problema nas lavouras do Estado. Está relacionada com os tipos de solos existentes e o processo de inundação das áreas, conseqüente anaerobiose e redução do Fe presente, podendo causar reduções de até 100% na produtividade, dependendo das cultivares utilizadas (AUDEBERT; FOFANA, 2009; BECKER; ASCH, 2005). Encontra-se, nos solos inundados com pH inferior a 5,5, concentrações extremamente grandes de Fe<sup>2+</sup> no solo, podendo variar de 500 a mais de 5.000 mg kg<sup>-1</sup>, já as concentrações nos tecidos das plantas de arroz estão geralmente entre 500 e 2.000 mg kg<sup>-1</sup>. As desordens fisiológicas são muito graves e ocorrem durante todo o período de cultivo do cereal. As plantas que sofrem de toxidez de ferro podem cobrir grandes áreas contíguas, como no Delta do Mekong no Vietnã ou nas planícies costeiras da África Ocidental e da Tailândia (CHEANEY; JENNINGS, 1975; BECKER; ASCH, 2005). Estudos demonstram que a concentração solúvel do Fe anterior à submergência do solo raramente excede 0,1 mg L<sup>-1</sup>, podendo após o alagamento elevar-se, em solos ácidos, a aproximadamente 600 mg L<sup>-1</sup> (DOBERMANN; FAIRHURST, 2000; SILVA, 2005). Em condições de alagamento, o ferro na forma férrica se transforma em ferro na forma ferrosa, assimilável pela planta, levando à toxidez por ferro e

consequentemente a um problema de mau desenvolvimento radicular, prejudicando a absorção de nutrientes, reduzindo a produtividade e, em muitos casos, causando a morte das plantas.

A toxidez por ferro é um dos estresses abióticos mais frequentes no arroz também em outros países, afetando em média de 15 a 30% da produção total nessas áreas (TADAIESKY, 2021), sendo considerado um dos limitantes ao rendimento do arroz irrigado nas principais regiões produtoras do Rio Grande do Sul e Santa Catarina (SANTIAGO, 2013). Os seus sintomas típicos, geralmente, são diminuição no comprimento da parte aérea e raiz, manchas marrons nas folhas, redução no índice de clorofila e toxidez indireta ou alaranjamento, que promove redução na absorção de nutrientes. A severidade da toxidez por ferro está associada aos teores de macro e micronutrientes na parte aérea das plantas de arroz causando os sintomas de desordens nutricionais por deficiência de outros nutrientes, como N, P, K, Mg, Ca, Zn, Cu, Mn (SCHMIDT, *et al.*, 2016; SOSBAI, 2018). Após o alagamento, se reduzem os óxidos férricos ( $\text{Fe}^{3+}$ ) a óxidos ferrosos ( $\text{Fe}^{2+}$ ), aumentando a disponibilidade desse íon e atingindo níveis tóxicos na planta, os quais em muitos casos coincidem com o final do afilhamento, que é a fase de desenvolvimento da cultura do arroz mais sensível à toxidez por Fe (SOUSA *et al.*, 2004).

Os solos com pH baixo potencializam à toxidez por Fe. A oxidação de  $\text{Fe}^{2+}$  para  $\text{Fe}^{3+}$  devido à liberação de  $\text{O}_2$  pelas raízes acidifica a rizosfera (importante para a absorção de P) e promove a formação da camada acastanhada nas raízes (SAHRAWAT *et al.*, 2005). Antes de serem observados os prejuízos devido à toxidez por ferro, uma série de sintomas e danos iniciais podem ser observados. Dentre estes estão o amarelecimento e a necrose foliar, o escurecimento das raízes, devido à presença de sulfato de ferro, e a perturbação catiônica, causando os sintomas de desordens nutricionais por deficiência de outros nutrientes, como a deficiência de potássio. Sintomas de bronzeamento nas folhas podem ser causados indiretamente pela toxicidade de Fe, Mn e Al, resultando em deficiência de P, K, Mg e Ca. Quando as concentrações de Fe, Mn e Al na solução do solo são altas, ocorre uma limitação no crescimento das raízes, sendo estas cobertas com uma camada de óxidos de  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Mn}^{2+}$ . Isso reduz a capacidade das raízes de absorver nutrientes (SCHMIDT

*et al.*, 2013). Esses sintomas são de toxidez direta e indireta e podem reduzir a produtividade da cultura (DOBERMANN, 2000).

A variação nas concentrações críticas de Fe causadoras de estresse às plantas na solução do solo é causada pelas diferenças na habilidade das raízes de arroz de resistir aos efeitos de toxicidade por Fe, que por sua vez depende do estado fisiológico e o crescimento das plantas, mas especialmente da cultivar (capacidade de oxidação das raízes). Assim, tem-se cultivares denominadas como sensíveis e tolerantes a toxidez por ferro. Dessa forma, é notável o papel do melhoramento genético na mitigação desse problema.

Nas cultivares tolerantes nota-se uma maior expressão de enzimas antioxidantes como: peroxidase, ascorbatoperoxidase, catalase e diidroascorbato redutase. Os captadores de radicais da enzima superóxido dismutase e peroxidase, influenciam dramaticamente na tolerância ao ferro, limitando a absorção do mesmo, através da formação de peróxido de hidrogênio no interior das folhas, que é um agente oxidante menos ativo do que os radicais (LIU *et al.*, 2017; WU *et al.*, 2017; MAHENDER *et al.*, 2019).

Uma estratégia que tem tido bons resultados e um grande potencial para obter germoplasma tolerante à toxidez por ferro é a indução de mutações. A indução com agentes físicos, como raios gama tem sido utilizada para melhorar a qualidade do grão e tolerância ao ferro (BACHA *et al.*, 2002), porém os mutagênicos químicos, como o Etilmetanosulfonato também são promissores para esse fim. Nos últimos anos, tem-se realizado mutações suprimindo a expressão de genes específicos, e desta maneira os genes relacionados à tolerância ao ferro têm sido identificados (RUENGPAYAK *et al.*, 2015; AUNG *et al.*, 2019; WU *et al.*, 2019), e mutantes tolerantes ao ferro tem sido isolados com sucesso.

O objetivo do presente trabalho foi revisar a importância e as bases genéticas da tolerância ao Fe em arroz e caracterizar um grupo de linhagens mutantes frente ao estresse.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Importância da cultura do arroz

De acordo com a FAO, o arroz é o alimento básico predominante para 17 países da Ásia e do Pacífico, nove países da América do Norte e do Sul e oito países da África. Este cereal é fonte de 27% do fornecimento mundial de energia alimentar, enquanto que o trigo fornece 19% e o milho 5%. Não só o arroz é uma fonte rica de energia, mas também é uma boa fonte de tiamina, riboflavina e niacina, assim como uma quantidade significativa de fibra dietética. O perfil de aminoácidos do arroz indica que ele tem alto conteúdo de ácido glutâmico e aspártico, enquanto a lisina é o aminoácido limitante (WALTER, 2008).

O arroz é o único cereal que é usado quase exclusivamente para a nutrição humana. É considerado uma das principais fontes de nutrientes do mundo, provendo elementos essenciais para a saúde humana (HUANG et al., 2020). Sendo um dos grãos mais antigos domesticados, estando intimamente associado com os estilos de vida e cultura de vários povos (GHIMIRE et al., 2015)

De acordo com as últimas estimativas da FAO, a produção mundial de arroz em 2021 terá um recorde de 519,5 milhões de toneladas. A estimativa da produção para a safra brasileira 2021 é de 11,1 milhões de toneladas, com redução de 0,7% em relação à 2020, segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2021). As exportações brasileiras de arroz no ano comercial 2020/21, que vai de março a fevereiro, foram as maiores dos últimos nove anos. Segundo dados da Associação Brasileira da Indústria do Arroz (Abiarroz) e do Sindicato da Indústria do Arroz no Estado do Rio Grande do Sul (Sindarroz-RS), responsável por quase 70,0% da produção nacional, foram 1,770 milhões de toneladas exportadas.

No mapeamento de arroz irrigado no Brasil, foi estimada uma área de 1,3 milhões de hectares de arroz irrigado no Brasil, com produtividade de 7.400 kg/há. Por outro lado, somente 23% da área e 10% da produção no Brasil corresponde a arroz sequeiro com uma produtividade de 2.100 kg/ha. O Rio Grande do Sul (72,9%), Santa Catarina (11,5%) e Tocantins (8,4%), respondem por 1,2 milhões dos 1,3 milhões do total de hectares de arroz identificados no Brasil (ANA; CONAB, 2020).

## 2.2 Melhoramento vegetal para tolerância ao estresse por ferro

Vários programas nacionais e organizações internacionais de pesquisa, como o International Institute of Tropical Agriculture (IITA) e West Africa Rice Development Association (WARDA agora AfricaRice) consideram a tolerância a toxidez por ferro dentre as principais prioridades no melhoramento do arroz. Nesse sentido, identificaram algumas variedades tolerantes à toxidez por ferro, como MatCandu, Gissi 27 e a bem conhecida Suakoko8, na Libéria (VIRMANI, 1977). Algumas das variedades com bons níveis de tolerância ao estresse são de ciclo tardio (165 a 170 dias) e com potencial de rendimento muito baixo (SIKIROU *et al.*, 2015). Têm sido realizado trabalhos de identificação precoce da tolerância ao ferro com meio de cultivo com ágar e solução nutritiva de Yoshida, avaliando o bronzeamento, mostrando-se uma ferramenta de seleção rápida (NUGRAHA *et al.*, 2016).

Estudos em banco de genes do IRRI, têm sido realizados, sob condições tóxicas de ferro, na busca de marcadores moleculares, visando o planejamento de cruzamentos (ONAGA *et al.*, 2013); estudos de correlação entre o comprimento de parte aérea e raiz (NUGRAHA *et al.*, 2016), e avaliações dos parentes selvagens de arroz e cultivares, onde não tem se achado diferenças significativas entre grandes grupos, mas sim individualmente (BIERSCHENK *et al.*, 2020). Esta informação genética é importante para a seleção de cultivares e dos métodos de seleção para obter variedades tolerantes.

Em populações de linhagens de introgressão recíproca, que compartilham os mesmos pais, sendo eles, uma variedade *japonica* que apresenta maior tolerância ao ferro e uma variedade *indica*, usando marcadores SNPs de alta densidade, foram encontrados QTLs de tolerância a toxidez por ferro, identificando regiões no cromossomo 11 (LIU *et al.*, 2016). Outro estudo, com retrocruzamento interespecífico entre *O. sativa* e *O. glaberrima*, detectou 28 QTLs em 18 regiões cromossômicas para 11 variáveis. Os QTLs detectados em novas regiões foram fornecidos pelo cultivar MG12 de *O. glaberrima*, e alguns desses QTLs corresponderam ao índice de bronzeamento (DUFHEY *et al.*, 2015). Há, entretanto, uma urgência de realizar esforços de pesquisa para entender a genética da tolerância a toxidez por ferro.

Um estudo de GWAS (*Genome-Wide Association Study*), com 329 acessos de subpopulações de *O. sativa*, demonstrou uma considerável variabilidade na tolerância a toxidez por ferro, além de identificar um loco associado ao bronzeamento foliar (MATTHUS et al., 2015). Por mapeamento associativo, com 352 linhas, também se tem chegado na conclusão de que existe uma grande variabilidade genética para a tolerância ao estresse (PAWAR et al., 2021).

### **2.2.1 Características de cultivares brasileiras de arroz irrigado frente a toxidez por ferro**

No contexto do melhoramento genético, as características são consideradas em conjunto, isto é, pouco adianta ter uma cultivar de arroz com somente tolerância ao Fe tóxico, e nenhum outro atributo produtivo. Assim, aqui são descritas cultivares com maior tolerância ao estresse abiótico, mas também quanto às suas demais qualidades (Tabela 1). Descrito com alta tolerância ao Fe tóxico, Avaxi CL, híbrido de ciclo precoce, também possui grande capacidade de emissão de afilhos e alta resistência à brusone. Dentro das cultivares convencionais desenvolvidas pelo Instituto Rio-Grandense do Arroz (IRGA), tem-se como tolerantes ao ferro, IRGA 431 CL, IRGA 425, IRGA 428CL e IRGA 424 CL. A cultivar IRGA 431 CL, com ciclo precoce de 120 dias, tem alto potencial produtivo, excelente qualidade de grãos, resistência à herbicidas do grupo químico das imidazolinonas e à brusone. Ainda, com tolerância moderada tem-se a cultivar, BRS PAMPA CL, desenvolvida pela Embrapa, com ciclo médio de 118 dias, estatura média de 95 cm e moderadamente resistente a brusone. Como medianamente tolerante está a cultivar GURI INTA CL, com ciclo médio de 125 a 130 dias, estatura média de 84 cm e suscetível a brusone.

A BRS Querência, é uma cultivar de tipo moderno-americano, lançada no ano de 2005, de ciclo precoce (106-120dias), com floração plena aos 85 dias, e maturação aos 110 dias, de folhas e grãos lisos, com colmos fortes e alta capacidade de afilhamento. Destaca-se pela panícula longa e com grande número de espiguetas férteis. Seus grãos são longo-finos, com elevado rendimento industrial, translúcidos e de ótima qualidade culinária. Medianamente suscetível a brusone e relativamente tolerante a toxidez indireta de ferro (SOSBAI, 2018). Apesar do avanço obtido com esses cultivares, a tolerância disponível nas mesmas ainda requer incremento.

Tabela 1 – Cultivares de arroz que possuem nível de tolerância e sensibilidade à toxidez por excesso de ferro conhecida.

Cultivares	Nível de tolerância a toxidez indireta
Epagri 106	Medianamente tolerante
Epagri 108	Tolerante
Epagri 109	Tolerante
SCS121 CL	Medianamente tolerante
BR/IRGA 409	Sensível
BR/IRGA 410	Sensível
BRS Querência	Tolerante
BRS Pampeira	Medianamente tolerante
BRS Pampa CL	Medianamente tolerante
IRGA 417	Sensível
IRGA 424	Tolerante
IRGA 428 CL	Tolerante
IRGA 424 CL	Tolerante
IRGA 431 CL	Tolerante
Avaxi CL	Tolerante
PUITAINTA-CL	Medianamente Sensível
GURI INTA CL	Medianamente Sensível

Fonte: SOSBAI, 2018.

### 2.2.2 Mutações em arroz

A primeira variedade mutante de arroz irrigado do Brasil foi a cultivar SCS 114 Andosan, obtida por mutação com raios gama, a qual apresentou 7,4 ~ 9,6% de aumento de rendimento sobre IR 841 e um teor de amilose superior (28%) do que IR 841 (19%). A variedade mutante também mostrou alta tolerância à toxidez por ferro e resistência à brusone (ISHIY *et al.*, 2005).

A mutação espontânea ocorre por erros na replicação do ácido desoxirribonucleico (DNA) e radiação do meio ambiente, ocasionando uma mudança hereditária na composição genética de um indivíduo. Com o tempo as mutações mais vantajosas, e com aptidão superior, prosperam, sendo que estas novas características adaptativas (mutantes), são também procurados pelo homem de maneira artificial (FAO/IAEA, 2021).

Os mutagênicos químicos são mais frequentemente aplicados na geração de variedades mutantes. Das cultivares mutantes obtidas por mutagênese química oficialmente liberadas registradas no MVD (The FAO/IAEA Mutant Variety Database), dentre os cereais destaca-se, o arroz com 64 variedades, cevada (37),

trigo (41). Dentre os principais agentes mutagênicos destaca-se o EMS (metanossulfonato de etila), com 16 variedades mutantes oficialmente registradas, NEU (nitrosoetil ureia) (6), MNU (N-metil N-nitrosoureia) (6), colchicina (1) e EI (etilenoimina) (7) (FAO/OIEA, 2021).

A importância no estudo de mutantes na investigação de mecanismos moleculares visando a tolerância ao ferro, se vê refletida em estudos recentes. A análise de mutantes pela genética direta, ou seja, do fenótipo para o gene, ou pela genética reversa, ou seja, do gene para o fenótipo, pode ser usada para entender a função do gene (LO *et al.*, 2016; VIANA *et al.*, 2019). Tem-se um exemplo importante onde a mutação de *OsAKT1* permitiu confirmar o envolvimento do gene na tolerância do arroz contra a toxicidade do Fe, na translocação do Fe da raiz para a parte aérea (WU *et al.*, 2019).

Os mutantes são uma reserva genética imperativa que pode ajudar como uma base informativa das dissimilaridades na cultura de arroz. Quando avaliados os mutantes de arroz com floração precoce induzida por EMS, para o estudo de tolerância ao estresse por um metal pesado (Zn), por meio de testes de características de crescimento da planta (biofísicas e bioquímicas), foram identificados mutantes que variaram na atividade antioxidante, e no conteúdo de clorofila (AFZAL *et al.*, 2019). Mais recentemente tem sido utilizado a técnica de CRISPR/Cas9 para mutações pontuais, onde o arroz mutado tem mostrado uma menor concentração de ferro na folha (CHE *et al.*, 2021).

Uma caracterização de mutantes de arroz no sul do Brasil mostrou variabilidade genética entre as famílias avaliadas para diversas características agrônômicas avaliadas (LUZ *et al.*, 2016). Geralmente essas mutações levam à alteração em mais de uma característica, como na indução de tolerância à estresses bióticos e abióticos (RAINÁ, KHAN, 2020; DA LUZ *et al.*, 2020).

Como relatado, diversos estudos têm sido feitos, utilizando a indução de mutação com agentes mutagênicos para tolerância ao ferro em arroz (RUENGPAYAK, 2015, WU *et al.*, 2019; CHE *et al.*, 2021), porém há poucos mutantes descobertos que tolerem a toxidez por ferro, sendo estes importantes para o desenvolvimento de novos genótipos. O mutante MuFR01 tolerou a toxicidade por ferro no estágio vegetativo e tinha 21-30% mais teor de Fe em grãos (RUENGPAYAK *et al.*, 2015). No Brasil, tem-se quatro variedades mutantes

registradas, IRAT 177, com alto afilhamento, SCS114 Andosan, com maturidade precoce, e SCS118 Marques, com qualidade superior, obtidos por raios gama, e SCS112 CL obtido por EMS (metanossulfonato de etila), resistente a herbicidas do grupo químico das imidazolinonas (FAO/IAEA-MVD, 2021). Com EMS acontece, alquilação de guanina, transições de G/C para A/T, ou transversões, com uma frequência de mutação de 2 a 10 mutações cada Mb (TILL *et al.*, 2007; VIANA *et al.*, 2019).

### **2.3 Toxidez por ferro em arroz**

A toxidez por ferro em arroz irrigado é um distúrbio nutricional que ocorre em lavouras de diversos países, principalmente na África, Ásia e América do Sul. No Brasil, já foi constatado nos Estados do Rio Grande do Sul (RS) e Santa Catarina (SC), que são os principais Estados produtores de arroz irrigado. Nesses Estados, a toxidez por ferro foi observada logo depois da década de setenta, quando predominavam cultivares do tipo tradicional e intermediário, com o surgimento de novas cultivares, no início da década de 1980. Neste período, os produtores, pesquisadores e extensionistas começaram a observar os sintomas de toxidez com maior frequência e intensidade, pois as variedades modernas, são mais sensíveis ao problema (SOUSA, 2004, SCHMIDT *et al.*, 2013).

A toxidez por excesso de ferro no solo na cultura de arroz irrigado no Rio Grande do Sul (RS) foi observada pela primeira vez no município de Uruguaiana, no início da década de 1980, logo após o lançamento da cultivar BR IRGA 409, que é sensível a esse distúrbio abiótico (LOPES *et al.*, 2015).

Em células vegetais, sob condições tóxicas de Fe, são produzidos radicais hidroxila (OH•) que são espécies reativas de oxigênio (ROS), no que se conhece como reação de Fenton. Estes radicais oxidam lipídios, proteínas e DNA e causam necrose. Os principais sintomas observados pela toxidez por ferro são o bronzeamento das folhas (pontos marrons nas folhas mais jovens), causadas pela deposição de ferro, se espalhando para as nervuras com a progressão da toxidez; as raízes se tornam escuras (marrom); diminuição dos grupos de clorofila nas folhas, provavelmente associado à deficiência de Mg, e de forma correlacionada diminuição na produtividade, baixa taxa de crescimento e esterilidade das espiguetas, causando diminuição da produtividade e, em casos mais severos, a morte da planta, sendo

estas reduções as mais pronunciadas nas cultivares sensíveis ao ferro (SAHRAWAT, 2000; DOS SANTOS *et al.*, 2020).

As desordens nutricionais associadas à toxidez por ferro são de dois tipos: toxidez direta (ou verdadeira) e toxidez indireta. A toxidez direta ou toxidez verdadeira é caracterizada pelo acúmulo de grandes níveis de ferro em tecidos vegetais (SILVEIRA *et al.*, 2007). A presença de pontuações que são chamadas de “bronzamento” é ocasionada pela morte das células nos locais onde o ferro está depositado. Ocorre também o retardo no crescimento afetando a produtividade (SAHRAWAT, 2005). A toxidez indireta é um distúrbio nutricional múltiplo, causado pela deficiência de outros nutrientes como K, P, Ca e Mg. Vários outros fatores, como o sulfeto de hidrogênio, o ácido orgânico e outros produtos de redução na solução do solo, participam do complexo fenômeno da toxicidade do ferro (TADANO; YOSHIDA, 1978). A redução na fotossíntese deve-se a limitações na fixação do carbono pelas plantas de arroz expostas ao excesso de ferro (MÜLLER, 2017). O limite crítico para o aparecimento de sintomas de toxidez por ferro em arroz varia de acordo com o pH da solução do solo, que pode variar de  $\pm 100 \text{ mg L}^{-1}$ , com um pH 3,7, a  $400 \text{ mg L}^{-1}$  ou mais, com pH 5,0 (TADANO; YOSHIDA, 1978; SILVA, 2005).

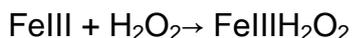
Altos níveis de ferro resultarão em efeitos tóxicos, e como defesa ocorre o aumento da produção de enzimas antioxidantes, superóxido dismutase e catalase, reduzindo a produção de ROS; o aerênquima radicular contribui para a formação de uma barreira oxidativa, reduzindo a mobilização de Fe na superfície radicular em plantas de arroz sob toxidez por Fe (TADAIESKY *et al.*, 2021).

## 2.4 Disponibilidade do ferro no solo

Com 5% da crosta terrestre, o ferro é o quarto elemento mais abundante na geosfera, apenas inferior ao oxigênio, alumínio e silício (GRAHAM *et al.*, 2000). O acúmulo em concentrações altas de Ferro é tóxico para a planta de arroz (ZHANG *et al.*, 2018). A toxicidade é comumente achada em solos de várzea mostrando abundância de ferro solúvel ( $\text{Fe}^{2+}$ ) no solo, gerando espécies reativas de oxigênio (ROS) e radicais hidroxila (OH) sob a situação tóxica.

A reação de Fenton é descrita como o potencial oxidativo aumentado de peróxido de hidrogênio, quando o Fe é usado como um catalisador em condições ácidas (AMETA *et al.*, 2018). Kwan e Voelke (2003), propuseram a seguinte cadeia

de reações em um sistema de oxidação catalisado por ferro pedológico:



Em células vegetais, muitas reações usam moléculas de oxigênio como aceptores de elétrons, gerando superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) e peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Essas espécies reativas de oxigênio (ROS) contribuem para a produção de radicais hidroxila extremamente reativos ( $\cdot\text{OH}$ ) através da chamada reação de Fenton com o envolvimento de  $\text{Fe}^{2+}$  catalítico, que ocorre excessivamente sob condições tóxicas de Fe (BECANA *et al.*, 1998).

Facilitando a disponibilidade do ferro no solo acha-se os ácidos orgânicos de baixo peso molecular, resultantes da decomposição microbiana da matéria orgânica e exsudatos de raízes de plantas (XIAO; WU, 2014). Esses ácidos orgânicos possuem uma forte capacidade quelante com cátions multivalentes, e podem influenciar significativamente a solubilidade de ferro (LINDSAY, 1991; SEBASTIAN; PRASAD, 2018).

A partir da rocha primária, após intemperismo, ocorre a formação dos óxidos de ferro. O conteúdo de ferro solúvel aumenta em um processo de redução rápida, quando a origem são óxidos de ferro mal cristalizados, como no caso da ferridrita na presença de ácidos orgânicos de baixo peso molecular, o que explicaria em parte a presença de mais de 50% do total de ferro livre em óxidos de ferro mal cristalizados (LIMA *et al.*, 2006). A matéria orgânica do solo influencia a dinâmica do ferro pelo seu efeito inibidor do processo de cristalização dos óxidos (JANSEN, 2004), os óxidos de ferro mal cristalizados, em função da alternância das condições dos minerais de ferro, dificultam também o processo de cristalização dos óxidos (KÄMPF; CURI, 2000). Ambas associações do ferro conferem uma maior reatividade química ao solo. A geoquímica do ferro é representada quantitativamente pela sequência: formas de maior grau de cristalinidade > formas complexadas com a matéria orgânica > formas de baixa cristalinidade (JANSEN *et al.*, 2004)

As substâncias húmicas formam complexos com ferro, e são reativas já que são capazes de reduzir o ferro (STRUYK; SPOCITO, 2001). A redução de Fe (III)

ocorre em níveis significativos em valores de pH inferiores a 4; em valores de pH mais altos, a redução é limitada pela formação de complexos entre Fe (III) e moléculas húmicas (RODEN *et al.*, 2010).

A degradação da matéria orgânica em solos de arrozais inundados é realizada por microrganismos anaeróbicos e facultativos, assim como a redução de óxidos de ferro. Os óxidos de ferro são um importante reservatório de elétrons, após o alagamento, os oxidantes (oxigênio>nitrato>sulfato e óxidos de ferro (III)) são reduzidos. Os óxidos de ferro mais cristalinos como lepidocrocita, goethita e hematita são menos eficazes, ao contrário do que sucede com óxidos férricos fracamente cristalinos como a ferridrita (PONNAMPERUMA, 1972; QU *et al.*, 2004; HORI *et al.*, 2010).

## 2.5 Mecanismos de tolerância ao ferro

Há quatro mecanismos de tolerância ao ferro conhecidos. O primeiro é a exclusão de Fe das raízes, através da oxidação rizosférica de Ferro (II) em Ferro (III), criando uma placa férrica. Este mecanismo favorece a baixa disponibilidade de Ferro (II) na solução do solo, com a exclusão de Fe (II) pela rizosfera. Os genótipos de arroz com maior capacidade de excluir Fe, como alto poder de oxidação da raiz e várias raízes laterais, podem ser superiores na tolerância ao excesso de Fe (AUNG *et al.*, 2020). Análises indicaram que a expressão de genes relacionados à captação e transporte de Fe, como *OsIRT1*, *OsIRT2*, *OsYSL2*, *OsYSL15* e *OsNRAMP1*, é altamente suprimida nas raízes na presença de níveis de excesso de Fe leves a altos (AUNG *et al.*, 2018).

O segundo mecanismo, trata-se da retenção de Fe nos tecidos radiculares e diminuição da translocação de Fe das raízes para a parte aérea. Genótipos tolerantes precipitam Fe intracelular e apoplástico nas raízes, protegendo a parte aérea da sobrecarga excessiva de Fe. Proteger a parte aérea, particularmente a folha mais nova, da toxicidade do Fe é importante para a sobrevivência das plantas de arroz, e o DC (centro de discriminação), região de acúmulo e distribuição de metais (MORI *et al.*, 1998), transporta o Fe para as folhas velhas em vez de para as folhas novas (AUNG *et al.*, 2018). Genes relacionados ao transporte de Fe, como *OsIRT1*, *OsYSL2*, *OsTOM1*, *OsNRAMP1* e *OsYSL15* são altamente suprimidos no DC, como nas raízes sob excesso de Fe (AUNG *et al.*, 2020).

O terceiro mecanismo é ativado quando os primeiros não são suficientes, e é a compartimentação do Fe na parte aérea. As plantas podem permitir o transporte de Fe das raízes através de DC para as folhas mais velhas para a subsequente prevenção da toxicidade do Fe por compartimentação, descarte ou armazenamento. O transportador de citrato, *OsFRDL1*, e seu homólogo *OsFRDL2*, ambos de regulação positiva, são necessários para a translocação de Fe da raiz para a parte aérea (AUNG *et al.*, 2018). Evitando assim, danos mediados pelo excesso de Fe nas folhas novas, particionando o excesso de Fe nas folhas velhas.

A ferritina é uma proteína de armazenamento de Fe onipresente que armazena Fe em um complexo (STEIN *et al.*, 2009; FINATTO *et al.*, 2015), e faz parte dos mecanismos dois e três. O óxido nítrico, estimula o acúmulo de mRNA e proteína da ferritina, sugerindo que é uma molécula sinalizadora para modular a homeostase do Fe em plantas (MURGIA *et al.*, 2002; RAMIREZ *et al.*, 2011). O excesso de Fe é isolado na ferritina de forma segura e biodisponível, pelos genes de ferritina de arroz, *OsFER1* e *OsFER2*, os quais são fortemente regulados positivamente em raízes e parte aérea por excesso de ferro (FINATTO *et al.*, 2015; AUNG *et al.*, 2018). A nicotianamina (NA), um aminoácido não proteínogênico, forma complexos estáveis com Fe (CURIE *et al.*, 2009), contribui para quelar o excesso de Fe em raízes e parte aérea, então pode ser armazenado como uma forma segura, pois o Fe quelado não causa a reação de Fenton. Também pode proteger a fotossíntese e a perda de água nas folhas durante o estresse excessivo de ferro, exibindo seu importante papel na mitigação do excesso de Fe nos mecanismos dois e três de tolerância ao excesso de Fe (AUNG *et al.*, 2020).

O quarto mecanismo de defesa é a proteção contra danos de ROS pela ação de enzimas antioxidantes (por exemplo, superóxido dismutase, peroxidase, catalase, ácido ascórbico e glutatona reduzida) (FANG *et al.*, 2001; WU *et al.*, 2017). O cultivo de arroz com várias concentrações de excesso de Fe e análises de microarranjos revelaram que o mecanismo de defesa molecular das defesas 1, 2 e 3 funcionam, desde que as condições de excesso de Fe sejam leves a moderadas. No entanto, os genes contribuem para o trabalho de defesa 4 em nível molecular em condições de excesso de Fe muito severas, o que causa bronzeamento foliar severo e reduz notavelmente o crescimento da planta (AUNG *et al.*, 2018; AUNG *et al.*, 2020).

Sob severo excesso de Fe, as plantas induzem a expressão de genes

associados ao estresse oxidativo ou fatores de transcrição relacionados à morte celular (*OsNAC4*, *OsNAC5* e *OsNAC6*) (FINATTO *et al.*, 2015; AUNG *et al.*, 2018), para aliviar os danos causados pelo excesso de ROS e outros estresses abióticos causados pelo excesso de Fe. Os fatores de transcrição WRKY são reguladores-chave de vários processos associados à tolerância ao estresse abiótico e biótico em plantas. A maioria dos genes *WRKYs* são críticos na regulação de vários estresses, envolvidos no mecanismo de defesa de ROS a vários estresses, incluindo o excesso de estresse de Fe (VIANA *et al.*, 2018; AUNG *et al.*, 2020).

## 2.6 Sistema hidropônico

O cultivo hidropônico oferece vantagens na condução de experimentos, como ter condições controladas de solução nutritiva, luz e temperatura. Os elementos essenciais para o crescimento das plantas ficam disponíveis nas soluções nutritivas na sua forma iônica, o qual permite uma fácil absorção pelas raízes; tanto no solo como na solução nutritiva (CORTÉS *et al.*, 2018; DOS SANTOS *et al.*, 2020). O cultivo hidropônico torna-se atrativo para a caracterização de genótipos tolerantes a estresse abiótico pois consegue manter os níveis de estresse uniformes mesmo utilizando um grande número de plantas (ELEC *et al.*, 2013). De maneira geral, os estudos com ferro que utilizam este sistema, vêm conseguindo avaliar com relativa facilidade os caracteres mais afetados na planta pelo estresse, sejam morfológicos, que possibilitam identificar plantas tolerantes, análises de expressão gênica e também a determinação de teor de nutrientes (CHE *et al.*, 2021; TADAIESKY *et al.*, 2021). A hidroponia permite avaliar tecidos fotossintéticos durante os estádios iniciais de crescimento vegetativo, o que aprimora uma quantidade impressionante de estudos, permitindo avaliar nessa fase crítica de sobrevivência, a tolerância ao estresse oxidativo (APEL; HIRT, 2004, WANG; FREI, 2011).

## 2.7 Análise multivariada para caracterização de variabilidade genética

Uma das diferenças entre a análise univariada e análise multivariada é que a última permite medir a força das relações entre várias medidas, de forma conjunta (OLKIN; SAMPSON, 2001). A Análise de Componentes Principais (PCA) é notoriamente uma das técnicas de análise multivariada de dados mais empregada em estudos de variabilidade genética (MAIONE; BARBOSA, 2019). O PCA usa uma

transformação de espaço vetorial para reduzir a dimensionalidade do conjunto de dados em um número menor de variáveis chamadas componentes principais (WOLD; ESBENSEN; GELADI, 1987), considerando que o PCA se baseia na determinação das direções ortogonais de dispersão máxima das amostras no espaço multidimensional definido pelas variáveis (RUTLEDGE; BOUVERESSE, 2013). Com um grupo de dados multivariados consegue-se avaliar as relações em termos de similaridade e dissimilaridade. O modelo é definido pelos vetores de direção, ou vetores de carregamento, chamados  $p_1$ ,  $p_2$ , ...,  $p_A$ , coletados em uma única matriz. Esses vetores formam uma linha para um componente, um plano para dois componentes e um hiperplano para três ou mais componentes. Esta linha, plano ou hiperplano define o modelo da variável latente. Uma interpretação equivalente do plano do modelo é que esses vetores de direção são orientados de forma que as pontuações tenham variância máxima para aquele componente. Nenhuma outra direção do vetor de carregamento (ou seja, nenhum outro hiperplano) fornecerá uma variação maior. Alguns valores de pontuação são positivos e outros negativos. Cada direção de carregamento aponta na direção que melhor explica os dados; mas esta direção não é única (DUNN, 2021). O PCA é usado principalmente como uma etapa inicial da análise antes da classificação, uma vez que é uma técnica útil para detectar padrões ocultos nos dados (MAIONE; BARBOSA, 2019).

O mapa de distância permite visualizar a distância média entre os elementos de dois grupos (*cluster*). Para decidir quais grupos devem ser combinados, ou onde um grupo deve ser dividido, é necessária uma medida de dissimilaridade entre conjuntos de observações (HAIR *et al.*, 2009). A escolha de uma linha de corte apropriada influenciará a forma dos agrupamentos, pois alguns elementos podem estar relativamente mais próximos uns dos outros dependendo da linha de corte utilizada (DANIELSSON, 1980; ELMORE, RICHMAN, 2001; MOHIBULLAH; HOSSAIN; HASAN, 2015).

Como parte do pré-processamento dos dados pode-se utilizar o método de agrupamento *K-means* que classifica os genótipos dentro de múltiplos grupos, de forma que a variação intra-grupos seja minimizada pela soma dos quadrados das distâncias Euclidianas entre os itens e seus centróides (KASSAMBARA, 2017). A distância euclidiana é um critério de ligação que especifica a dissimilaridade dos

conjuntos em função das distâncias entre pares de observações nos conjuntos (HAIR *et al.*, 2009).

Equação da distância Euclidiana:

$$\|a - b\|_2 = \sqrt{\sum_i (a_i - b_i)^2}$$

Para o mapa de distância genética, escolhe-se o agrupamento com o menor erro quadrado (menor soma dos quadrados das distâncias entre os centróides e os respectivos pontos pertencentes ao agrupamento correspondente) (LAURETTO, 2017). Alguns critérios de ligação comumente usados entre dois conjuntos de observações A e B é o Agrupamento de ligação média não ponderada (UPGMA- *Unweighted Pair-Group Method of Arithmetic Averages*).

Equação do critério de ligação UPGMA:

$$\frac{1}{|A| + |B|} \sum_{a \in A} \sum_{b \in B} d(a, b)$$

Onde d, é o ponto de corte escolhido.

O UPGMA permite a fusão de grupos quando a similaridade atinge o valor médio de similaridade intergrupo. O algoritmo UPGMA é um bom arranjo entre a ligação simples e a ligação completa porque preserva a maioria das distâncias iniciais em espaço dimensionalmente reduzido. Os dendogramas construídos com o método UPGMA fornecem os menores valores de distância cofenética, isto é, os valores numéricos de comprimento total dos ramos do dendrograma (MOUCHET *et al.*, 2008).

Na mineração de dados, a análise de agrupamento hierárquico ou HCA, é uma tarefa principal de análise exploratória de dados. No entanto, as classificações hierárquicas são imagens unidimensionais de dados dispersos em um espaço de “n” dimensões. Portanto, nenhum dos algoritmos de agrupamento (mesmo o UPGMA) corresponde perfeitamente à distribuição de objetos em um espaço multidimensional (MOUCHET *et al.*, 2008). Para o conjunto de dados de (altas dimensões), onde a visualização do conjunto de dados não é possível, os dendogramas desempenham um papel importante para encontrar o número ideal de grupos. A hierarquia resultante pode ser facilmente processada de modo a fornecer várias maneiras de visualização e exploração de dados (CAMPELLO *et al.*, 2015).

### **3 CAPÍTULO I. CARACTERIZAÇÃO DE FAMÍLIAS MUTANTES DE ARROZ (*Oryza sativa* L.) IRRIGADO PARA TOLERÂNCIA AO EXCESSO DE FERRO**

#### **3.1 INTRODUÇÃO**

O arroz é uma das plantas cultivadas mais importantes para a maioria dos países em desenvolvimento do planeta. Proporciona dois terços das calorias à população na Ásia e um terço na África e América Latina. Os maiores países produtores são, em ordem decrescente: China, Índia, Indonésia, Bangladesh, Vietnã, Birmânia, Tailândia, Filipinas e Brasil. O Brasil é o maior produtor fora do continente asiático, e responde por quase a metade do arroz da América Latina e Caribe (FAOSTAT, 2021).

A toxidez por ferro apresenta-se como um grave problema nas lavouras do Estado, estando relacionada com os tipos de solos existentes e, acima de tudo, com a inundação das áreas, podendo causar reduções de até 100% na produtividade, dependendo das cultivares cultivadas e da intensidade do estresse (AUDEBERT; FOFANA, 2009). É, de fato, um dos estresses abióticos mais frequentes no arroz também em outros países, afetando em média de 15% a 30% da produção total nessas áreas (TADAIESKY, 2021). Este estresse é considerado um dos limitantes ao rendimento do arroz irrigado nas principais regiões produtoras do Rio Grande do Sul e Santa Catarina (SANTIAGO, 2013). A toxidez por ferro, aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio, como o peróxido de hidrogênio. Os seus sintomas típicos geralmente são diminuição no comprimento da parte aérea e raiz, manchas marrons minúsculas a partir das pontas das folhas, que se espalham para as bases inferiores das mesmas (SAHRAWAT *et al.*, 2004; SILVEIRA *et al.*, 2007) e redução na concentração de clorofila (STEIN *et al.*, 2009). A toxicidade do ferro (Fe) é reconhecida como uma das desordens minerais mais difundidas na produção de arroz de várzea (AUDEBERT; FOFANA, 2009), podendo ocorrer por absorção excessiva (toxidez direta ou bronzeamento) ou por deficiência nutricional múltipla (toxidez indireta ou alaranjamento) (SOSBAI, 2018). Uma técnica utilizada para incrementar a variabilidade genética para fins de melhoramento é a indução a mutações por tratamentos mutagênicos (SERRAT *et al.*, 2014).

A toxidez por excesso de ferro no cultivo do arroz é uma das limitações a ser

considerada no sistema de irrigação por inundação, sendo difícil de ser mitigada por meio de manejo. Assim, é constante a busca por fontes de tolerância genética por parte dos melhoristas. A principal forma de mitigar os efeitos do estresse, é a utilização de cultivares com elevada tolerância, isto é, o melhoramento genético é o fator-chave neste processo. Neste sentido, o Centro de Genômica e Fitomelhoramento tem disponível um grupo de famílias mutantes de arroz obtidos da cultivar BRS Querência, algumas das quais, durante a avaliação na geração M<sub>3</sub>, mostraram-se superiores para os caracteres agrônômicos, comprimento da panícula principal, peso da panícula principal, peso dos grãos da panícula principal, e para a largura da folha bandeira (LUZ *et al.*, 2016).

Diante do exposto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a tolerância ao estresse por ferro em famílias de mutantes de BRS Querência em sistema hidropônico.

## **3.2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.2.1 Período e Localização do experimento**

O experimento foi realizado de 2019 a 2020, em ambiente controlado no Laboratório de Hidroponia, pertencente ao Centro de Genômica e Fitomelhoramento, da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel (FAEM), da Universidade Federal de Pelotas (UFPeI), no município de Capão do Leão - RS.

### **3.2.2 Grupo de mutantes**

Um total de 92 famílias mutantes avançadas de arroz (*Oryza sativa* L.) foram avaliadas em condições hidropônicas. Estas famílias se encontram na geração M<sub>8</sub>, as quais foram desenvolvidas a partir da cultivar BRS Querência (Embrapa), através do tratamento com o mutagênico químico etilmetanosulfonato (EMS) a 1,5%, nas dependências do Centro de Genômica e Fitomelhoramento da UFPeI (LUZ *et al.*, 2016). A cultivar BRS Querência também foi avaliada, como testemunha, juntamente com a cultivar BR IRGA 409, reconhecida como sensível a toxidez por ferro, e a Epagri 108, reconhecida como tolerante.

### 3.2.3 Condições experimentais

Para as avaliações, as sementes das famílias mutantes e das testemunhas da safra do ano, foram desinfestadas com álcool na concentração de 70% (v/v), por um período de um minuto, logo lavadas com água destilada, em seguida submersas em solução de hipoclorito de sódio (NaClO), na concentração de 4% (v/v), por cinco minutos, e, finalmente, foram realizadas duas lavagens com água destilada. Após a desinfestação, as sementes foram semeadas em papel de germinação (Germitest®), umedecido 2,5 vezes o peso do papel seco com água destilada, e mantidas em câmara de germinação (BOD) a 25°C, com fotoperíodo de 16 horas e umidade relativa mínima requerida para a germinação das sementes, com o método sobre papel, conforme estabelecido nas Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009), permanecendo nestas condições durante 7 dias. Posteriormente, aproximadamente 10 plântulas, com desenvolvimento normal e uniformes, foram transplantadas para telas de nylon, adaptadas em tampas de recipientes de 700 mL, para serem cultivadas em sistema hidropônico, em condições controladas, iluminação artificial com fotoperíodo de 16-8h, e temperatura de  $27 \pm 2^\circ\text{C}$ , com a solução nutritiva padrão para arroz, preparada de acordo com SINGH et al., 2010 conforme os reagentes da Tabela 2, onde permaneceram por 7 dias.

Após, todos os genótipos foram submetidos parte na condição controle (condição ótima) e parte sob estresse por excesso de ferro, durante 14 dias (um recipiente em cada condição, por unidade experimental). Na solução controle foram adicionados  $2 \text{ mg L}^{-1}$  de Ferro (Fe), na forma,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , sendo a dose recomendada para o desenvolvimento de plantas, enquanto que a solução de tratamento (estresse) foi de  $400 \text{ mg L}^{-1}$  de ferro. A escolha da concentração foi baseada em um estudo preliminar com doses de 0, 200, 300,  $400 \text{ mg L}^{-1}$  de ferro e estudos desenvolvidos, que avaliaram diferentes concentrações de estresse de ferro em arroz (ELEC, 2013; SINGH, 2010, SOUSA *et al.*, 2015).

As soluções foram preparadas com a adição de EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético), na proporção 1:0,38 molar (Fe:EDTA). O pH utilizado neste trabalho foi de 4,0, utilizando NaOH ou HCl e posteriormente fixado com o reagente químico MES [monohydrate: 2-(N-Morpholino) ethanesulfonicacidhydrate]. A perda de água

por evaporação foi reabastecida diariamente com água destilada. A solução nutritiva foi renovada a cada sete dias para garantir que as concentrações dos nutrientes e de ferro estiveram nos intervalos próximos aos valores pré-estabelecidos. Assim, na condição controle, as plantas permaneceram 21 dias em solução nutritiva padrão, já na condição de estresse, 7 dias em solução nutritiva e após 14 dias em solução nutritiva acrescida de  $400\text{mg L}^{-1}$  de ferro.

Tabela 2 – Solução de Yoshida modificada.

Estoque	Reagente	$\text{g L}^{-1}$
1	Nitrato de amônio - $\text{NH}_4\text{NO}_3$	91,40
2	Sulfato de potássio - $\text{K}_2\text{SO}_4$	97,80
3.(a)	Fosfato monopotássio- $\text{KH}_2\text{PO}_4$	29,00
3.(b)	Fosfato dipotássio - $\text{K}_2\text{HPO}_4$	8,00
4	Cloreto de cálcio dihidratado - $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	117,36
5	Sulfato de magnésio - $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	324,00
6.(a)	Cloreto de manganês - $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1,50
. (b)	Molibdato de amônia - $(\text{NH}_4)_6 \cdot \text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,074
. (c)	Ácido bórico - $\text{H}_3\text{BO}_3$	0,934
. (d)	Sulfato de zinco - $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,035
. (e)	Sulfato de cobre - $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,031
7.(a)	Sulfato ferroso - $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	7,92
7.(b)	Ácido EDTA	3,19

### 3.2.4 Avaliações fenotípicas

Aos 21 dias, após o transplante das plântulas para o sistema hidropônico, foi feita a avaliação das seguintes variáveis: comprimento da parte aérea (CPA), comprimento de raiz (CR), massa seca de parte aérea (MSPA) e massa seca de raízes (MSR) e nível de bronzeamento (mancha foliar). O nível de bronzeamento (mancha) foi avaliado de forma visual, segundo escala adaptada do IRRRI (2002), determinando-se uma nota de zero a seis pontos para cada situação, sendo de zero para folhas sem manchas, de 1 para folhas com 1% de mancha, 2 com 1-4% de manchas, 3 contendo 4-10% de manchas, 4 com 11-25% de manchas, 5 com 26-50% da folha contendo manchas, e 6 com 51-100% de manchas na folha. Também foram avaliadas as variáveis: clorofila a (Cla), clorofila b (Cib), medidas com o auxílio do equipamento digital clorofiLOG (Falker) (índice SPAD). As leituras do clorofilômetro foram realizadas na parte central da segunda folha.

### 3.2.5 Delineamento experimental e análises estatísticas

O estudo foi realizado seguindo o delineamento experimental de blocos casualizados, com três repetições, onde a unidade de observação constituiu-se de dois vasos (estresse e controle) com 10 plantas por genótipo. Para a comparação de médias das variáveis analisadas, foi realizado o desempenho relativo (DR) comparando as plantas sob estresse em relação às plantas sem estresse (controle), de acordo com a equação:  $DR = (X \text{ estresse} / X \text{ controle}) \cdot 100$ , onde X representa o valor observado. Os dados foram submetidos à análise de variância ( $p \leq 0,05$ ), e realizou-se o teste de agrupamento de médias desenvolvido por Scott e Knott (1974) a 5% de probabilidade de erro. As análises estatísticas foram realizadas com a utilização do programa computacional Genes (CRUZ, 2001).

### 3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da análise de variância realizada entre os genótipos demonstraram diferenças significativas pelo teste F ( $p \leq 0,05$ ) para todas as variáveis analisadas nas famílias mutantes e as cultivares BRS Querência, BR IRGA 409 e EPAGRI 108 (Tabela 3). O coeficiente de variação indica o nível de confiabilidade experimental (CARVALHO *et al.*, 2004). Os coeficientes de variação encontrados foram classificados em médios, para as variáveis comprimento de parte aérea (cpa), massa seca de parte aérea (mspa), clorofila a (cla), clorofila b (clb); altos, para as variáveis comprimento de raiz (cr), e mancha foliar (mf), e muito alto, para massa seca de raiz (msr), de acordo com a classificação proposta por Pimentel-Gomes e Garcia (2002) a qual baseou-se em experimentos com relativa estabilidade. Os resultados apresentados demonstram que há necessidade de se considerar o tipo de experimento instalado, sendo que se teve um controle relativo das condições ambientais e pode-se observar que a maioria das variáveis apresentaram coeficiente de variação (CV) inferior a 30% (médio), permitindo confiabilidade, como uma metodologia reproduzível.

Tabela 3 - Resumo da análise de variância para o desempenho relativo das variáveis comprimento de parte aérea (DR cpa), comprimento de raiz (DR cr), matéria seca de parte aérea (DR mspa), matéria seca de raiz (DR msr), índice de clorofila a (DR cla), índice de clorofila b (DR clb) e mancha foliar (DR mf) de 92 famílias mutantes M8 e as cultivares BRS Querência, BR IRGA 409 e Epagri 108. CGF/FAEM/UFPEL, 2021.

FV	GL	Quadrado Médio						
		DR cpa	DR cr	DR mspa	DR msr	DR cla	DR clb	DR mf
Genótipos	94	409,75*	477,13*	523,01*	1197,21*	399,67*	474,94*	26871,48*
Blocos	2	3400,86	19929,71	3733,92	3440,35	258,16	1460,13	221910,55
Resíduo	188	179,28	268,08	192,56	410,22	145,03	155,31	9330,81
Média geral	-	79,63	69,03	76,49	64,25	87,18	87,78	354,96
CV (%)	-	16,81	23,71	18,13	31,52	13,81	14,19	27,21

\*Valores significativos ao nível de 5% de probabilidade de erro. FV=Fonte de Variação; GL: Graus de Liberdade; CV (%): Coeficiente de Variação.

Os resultados obtidos pelo teste de Scott-Knott, para as 7 variáveis analisadas estão inclusas nas Tabelas 4 a 10. É possível verificar variabilidade genética entre as famílias mutantes avaliadas, quando submetidas ao estresse por excesso de ferro, pois para todas as variáveis ocorreram famílias com médias de desempenho relativo significativamente diferentes das testemunhas.

Para o desempenho relativo do comprimento de parte aérea, pode ser observada a formação de dois grupos (Tabela 4). No grupo A, encontram-se 45 famílias com DRcpa superiores a testemunha BRS Querência (DRcpa = 67,67%). As famílias apresentaram média de DR variando de 126 % (família 54) até 80,29 % (família 68), em que o desempenho desse grupo foi significativamente semelhante a testemunha Epagri 108 (DRcpa = 82,17%). Já o grupo B, composto por 47 famílias apresentou DRcpa não diferindo significativamente das testemunhas BRS Querência (DRcpa = 67,67%) e BR IRGA 409 (DRcpa = 73,85%) com médias de DRcpa variando de 79,34% (família 14) até 51,92% (família 52).

Em um estudo comparativo, obteve-se redução na parte aérea e na raiz, afetando em maior medida a cultivar sensível ao ferro IR64 (BODE *et al.*, 1995). Foi relatado em uma triagem para avaliação da tolerância ao ferro com mutantes obtidos por raios gama, por regeneração de tecidos, onde foi observada alterações nas plântulas avaliadas em 4 semanas, em uma condição de 300 µM de Fe e pH 4,2,

apresentando, redução no comprimento de parte aérea e raiz (PATHIRANA *et al.*, 2002).

A homeostase do Fe desempenha um papel importante nos primeiros estágios de crescimento (INOUE *et al.*, 2009), mutantes superexpressos para *OsYSL15* sob déficit de Fe, acumulam mais Fe, demonstrando um desequilíbrio dos íons metálicos, resultando em um crescimento defeituoso, com plantas mais curtas. Esses resultados demonstram o papel importante de *OsYSL15* na absorção e distribuição de Fe em plantas de arroz (LEE *et al.*, 2009).

No presente estudo se obteve mutantes apresentando maior comprimento de parte aérea do que a cultivar BRS Querência, o que poderia acontecer, devido a expressão de genes relacionados com a homeostase, e que moléculas sinalizadoras como o óxido nítrico, estejam estimulando o acúmulo de mRNA e proteína de ferritina. Todas estas afirmações são meramente especulações, que seriam corroboradas com um estudo de expressão gênica.

Tabela 4 - Desempenho relativo da variável comprimento de parte aérea (DR cpa) de 92 famílias mutantes e as testemunhas BRS Querência, BR IRGA 409 e Epagri 108. CGF/FAEM/UFPEL, 2021.

Desempenho relativo do comprimento de parte aérea (%)												
Grupo	Maior média	Menor média	Famílias M <sub>8</sub> (ordem decrescente de acordo com a média)									
A	126,04	80,29	54	59	61	45	80	83	81	13	88	67
			50	11	55	70	91	60	6	3	9	79
			74	51	62	92	12	85	46	48	49	82
			58	22	90	89	47	78	69	57	86	1
			108	77	5	10	4	68				
B	79,34	51,92	14	24	63	87	71	53	7	37	18	66
			8	41	73	29	75	23	409	33	20	32
			34	15	84	76	42	65	21	39	28	2
			30	26	16	40	72	19	43	BRQ	31	27
			56	35	44	36	64	38	17	25	52	

\* Famílias pertencentes ao mesmo grupo não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade de erro. Testemunhas: **93** (Epagri 108, DR cpa (%) =82,17); **94** (BR IRGA 409, DR cpa (%) = 73,85); **95** (BRS Querência, DR cpa (%) = 67,67).

Em relação ao desempenho relativo do comprimento de raiz (DRcr), o teste de agrupamento de médias de Scott-knott evidenciou novamente a formação de dois grupos (Tabela 5). O grupo A foi formado por 49 famílias mutantes e as testemunhas BRS Querência (DRcr= 69,51 %) e Epagri 108 (Dcr = 71,03%). A maior média de DRcr encontrado neste grupo foi de 109,03 % (família 6) e a menor 68,92% (família 77). Sendo o grupo B, formado por 43 famílias e a testemunha BR IRGA 409 (DRcr

= 59,20 %), com médias de DRcr entre 67,91% (família 45) e 37,16 % (família 37). Nesta variável não foram encontradas famílias mutantes superiores a BRS Querência, mas foram detectadas famílias mutantes mais sensíveis que BRS Querência, indicando que a mutação pode levar a uma maior sensibilidade ao excesso de Fe, sendo que a BRS Querência também tem sido classificada como moderadamente tolerante (DO AMARAL *et al.*, 2016).

Mutações induzidas pelos métodos tradicionais são eventos randômicos no DNA e, por exemplo, quando ocorre uma perda da função de um gene importante, como por exemplo por uma eventual deleção, a mutação poderá ser deletéria. Foi demonstrado em um estudo com mutantes, que a perda de função de *OsAKT1* do canal de íons de potássio afeta a translocação de ferro em plantas de arroz expostas à toxicidade de ferro, de maneira que aumenta a sensibilidade ao excesso de Fe em relação aos sintomas de bronzeamento da folha, geração de espécies reativas de oxigênio, índices de refletância espectral da folha e fluorescência da clorofila (WU *et al.*, 2019). A toxidez por ferro causa distúrbios nutricionais, afetando o crescimento da raiz, apresentando um crescimento atrofiado, sendo um dos primeiros sintomas da toxicidade ao ferro (FAGERIA *et al.*, 2008; DO AMARAL *et al.*, 2016). As plantas quando expostas ao estresse por ferro durante 14 dias, apresentam raízes mais curtas, sendo mais severa e notavelmente afetado o comprimento da raiz do que o comprimento da parte aérea (AUNG *et al.*, 2018).

Tabela 5 - Desempenho relativo da variável comprimento de raiz (DR cr) de 92 famílias mutantes e as testemunhas BRS Querência, BR IRGA 409 e Epagri 108. CGF/FAEM/UFPel, 2021.

Desempenho relativo do comprimento de raiz (%)												
Grupo	Maior média	Menor Média	Famílias M <sub>8</sub> (ordem decrescente de acordo com a média)									
A	109,03	68,92	6	61	54	50	51	81	24	33	35	9
			92	4	88	13	5	2	49	1	22	12
			3	18	80	75	58	59	91	14	11	83
			79	29	85	36	20	57	8	70	7	10
			39	108	84	34	52	19	43	BRQ	17	89
			77									
B	67,91	37,16	45	30	64	46	41	78	68	90	66	15
			82	71	44	87	55	73	40	42	28	26
			60	409	69	53	47	27	76	32	86	74
			23	67	62	21	48	16	65	31	72	38
			63	56	25	37						

\* Famílias pertencentes ao mesmo grupo não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade de erro. Testemunhas: **93** (Epagri 108, DR cr (%) = 71,03); **94** (BR IRGA 409, DR cr (%) = 59,20); **95** (BRS Querência, DR cr (%) = 69,51).

Quanto a matéria seca de parte aérea, verificou-se, outra vez, a formação de dois grupos pelo teste de agrupamento de média de Scott-Knott (Tabela 6). O grupo A foi formado por 48 famílias mutantes superiores a BRS Querência (DRmspa = 64,89 %), contendo o cultivar Epagri 108 (DRmspa = 84,22), com médias que variaram de 113,68 % (família 13) até 76,28 % (família 67). No grupo B, encontram-se 44 famílias (48,42 %), que apresentaram DRmspa significativamente não diferindo à testemunha BRS Querência (DRmspa = 64,89 %), e BR IRGA 409 (DRmspa = 73,36%), com médias que variaram de 75,79 % (família 79) a 46 % (família 78).

A seleção de famílias com constituições genéticas com elevada produção de fitomassa da parte aérea, poderá otimizar a utilização da luz solar (fotoassimilados) refletindo esse comportamento em condições de estresse por ferro. Neste sentido, as famílias pertencentes ao grupo A, com maior matéria seca de parte aérea poderão ser potenciais genótipos para estudos visando a tolerância ao estresse. Os resultados obtidos, mostraram menor biomassa na cultivar sensível BR IRGA 409 e nos mutantes do grupo B, assim como na cultivar BRS Querência, sendo que as plantas sob estresse por ferro apresentam menor biomassa. Resultados semelhantes foram encontrados em avaliações feitas em condições de campo em genótipos brasileiros, no qual constataram uma redução nos comprimentos e na massa seca tanto de parte aérea quanto de raiz sob efeito do excesso de  $Fe^{2+}$  (SOUZA *et al.*, 2008; WANG; FREI, 2011).

Tabela 6 - Desempenho relativo da variável matéria seca de parte aérea (DR mspa) de 92 famílias mutantes e as testemunhas BRS Querência, BR IRGA 409 e Epagri 108. CGF/FAEM/UFPel, 2021.

Desempenho relativo da matéria seca de parte aérea (%)												
Grupo	Maior média	Menor Média	Famílias M <sub>8</sub> (ordem decrescente de acordo com a média)									
A	113,68	76,28	13	1	80	91	81	6	9	42	24	5
			49	8	12	2	3	52	26	89	50	88
			69	20	51	85	73	28	11	108	74	84
			66	48	27	7	32	63	83	77	56	76
			39	43	53	61	36	59	86	87	67	
B	75,79	46	79	82	15	18	10	409	37	23	25	38
			92	35	4	71	64	19	31	68	40	62
			33	22	21	65	55	14	34	16	BRQ	90
			29	41	75	17	47	72	70	54	46	60
			30	45	44	57	58	78				

\* Famílias pertencentes ao mesmo grupo não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade de erro. Testemunhas: **93** (Epagri 108, DR mspa (%) = 84,22); **94** (BR IRGA 409, DR mspa (%) = 73,36); **95** (BRS Querência, DR mspa (%) = 64,89).

Para a variável MSR verificou-se a formação de quatro grupos pelo teste de agrupamento de médias de Scott-Knott (Tabela 7). O grupo A, com a família mutante 13 e o grupo B, com a família mutante 6, sendo estes superiores a Epagri 108 e a BRS Querência, o grupo C, com 31 famílias mutantes superiores a BRS Querência e contendo o cultivar Epagri 108, com médias entre 103,58 % (família 3) e 70,44 % (família 73). Finalmente, o grupo D, com 59 famílias mutantes e as cultivares BRS Querência (DRmsr = 67,01%) e BR IRGA 409 (DRmsr = 58,94%), com médias de 67,92% (família 91) até 26,46% (família 10). Assim, os efeitos da toxicidade do ferro na redução do crescimento e na redução da biomassa são consistentes com os resultados apresentados. O caráter MSR é importante no melhoramento de plantas, uma vez que quanto mais raízes apresentar uma planta, maior é a possibilidade de a mesma tolerar o excesso de ferro (AUNG *et al.*, 2018). Entretanto, um valor muito elevado para o caráter pode ser causado pela toxicidade (BECKER *et al.*, 2005). Quanto a este caráter, as famílias 13 e 6 apresentaram as maiores médias. Isto evidencia que nessas famílias, assim como nas famílias do grupo C, tenham ocorrido mutações no sentido de aumentar o número de raízes nas plantas. Plantas com maior número de raízes poderão ser promissoras, mediante ao aumento na otimização da utilização dos fotoassimilados (ONYANGO *et al.*, 2019).

Tabela 7 - Desempenho relativo da variável matéria seca de raiz (DR msr) de 92 famílias mutantes e as testemunhas BRS Querência, BR IRGA 409 e Epagri 108. CGF/FAEM/UFPel, 2021.

Desempenho relativo da matéria seca de raiz (%)													
Grupo	Maior média	Menor média	Famílias M <sub>8</sub> (ordem decrescente de acordo com a média)										
A	153,75	153,75	13										
B	112,56	112,56	6										
C	103,58	70,44	3	53	50	27	5	81	77	2	59	29	
			26	76	1	11	4	40	22	108	24	51	
			79	12	42	57	38	74	7	28	32	62	
			68	73									
D	67,92	26,46	91	BRQ	34	9	89	19	37	70	85	43	
			25	69	66	14	8	78	88	83	409	80	
			60	39	49	31	21	65	61	45	36	55	
			33	23	63	58	82	54	41	47	35	44	
			48	87	30	46	20	75	17	64	72	71	
			15	67	92	56	84	16	18	90	86	52	
			10										

\* Famílias pertencentes ao mesmo grupo não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade de erro. Testemunhas: 93 (Epagri 108, DR msr (%) = 80,77); 94 (BR IRGA 409, DR msr (%) = 58,94); 95 (BRS Querência, DR msr (%) = 67,01).

Quanto ao índice de clorofila a, verificou-se a formação de dois grupos pelo teste de agrupamento de média de Scott-Knott (Tabela 8). O grupo A, foi formado por 42 famílias mutantes e as cultivares Epagri 108 (DRcla = 94,09 %) e BRS Querência (DRcla = 90,20 %), com médias que variaram de 128,84 (família 26) até 88,03 (família 50). No grupo B, encontram-se 50 famílias e a cultivar BR IRGA 409 (DRcla = 83,66%), com médias que variaram de 86,83 % (família 80) a 41,16 % (família 40).

A seleção de famílias com constituições genéticas com elevado índice de clorofila a, poderá otimizar a utilização da luz solar (fotoassimilados). No entanto, nenhum dos mutantes superou drasticamente a BRS Querência. Ainda pode-se perceber que a toxicidade por ferro diminuiu a clorofila a para a cultivar sensível BR IRGA 409, mas também para a tolerante Epagri 108. Estes resultados concordam com um estudo desenvolvido por Dos Santos et al., (2020), que avaliaram as cultivares de arroz IRGA 409 e Epagri 109 em condições hidropônicas, onde como resultado quanto a toxidez por ferro ocorreu uma diminuição no caráter clorofila a, medido por fluorescência. Dentre os efeitos da toxidez por ferro estão os desequilíbrios nutricionais, seja por antagonismo ou acúmulo de placa férrica nas raízes, uma diminuição na taxa de transporte de elétrons, estando associado a deficiência de Mg, que por sua vez, diminui os *pools* de clorofila nas folhas de arroz (PENG *et al.*, 2019). O grupo B teve as reduções de clorofila mais pronunciadas, com relação a clorofila b. De fato, altos níveis de ferro afetam as reações fotoquímicas (MÜLLER *et al.*, 2015).

Tabela 8 - Desempenho relativo da variável índice de clorofila a (DR cla) de 92 famílias mutantes e as testemunhas BRS Querência, BR IRGA 409 e Epagri 108. CGF/FAEM/UFPel, 2021.

Desempenho relativo do índice de clorofila a (%)												
Grupo	Maior média	Menor Média	Famílias M <sub>8</sub> (ordem decrescente de acordo com a média)									
A	128,84	88,03	26	7	23	20	91	19	5	43	66	24
			21	67	84	25	36	75	3	41	63	9
			29	64	108	68	12	81	28	1	38	13
			71	59	4	39	34	BRQ	18	10	79	86
			51	22	92	50						
B	86,83	41,16	80	15	74	55	30	31	65	47	76	44
			62	72	409	57	85	46	16	77	14	70
			33	35	6	32	89	88	87	82	53	52
			90	11	49	83	48	8	37	78	17	73
			45	56	69	42	61	58	2	27	60	54
			40									

\* Famílias pertencentes ao mesmo grupo não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade de erro. Testemunhas: **93** (Epagri 108, DR cla (%) = 94,09); **94** (BR IRGA 409, DR cla (%) = 83,66); **95** (BRS Querência, DR cla (%) = 90,20).

Em relação ao caráter clorofila b (Clb), ocorreu a formação de quatro grupos (Tabela 9). O grupo A: formado pela família mutante 26. O grupo B: formado por cinco famílias, 7, 20, 25, 23, 66. As famílias deste grupo apresentaram médias que variaram de um valor máximo de 116,09 % (família 7) a um mínimo de 106,83 % (família 66), ambos grupos com médias superiores à da BRS Querência. Em contrapartida, o grupo C, formado por 37 famílias mutantes com média não diferindo significativamente da apresentada pela cultivar BRS Querência (DRclb = 93,83%) (DRclb), e da cultivar Epagri 108 (DRclb = 91,76%), apresentando médias que variaram de 105,31 % (família 5) até 88,43 % (família 29). O grupo D foi formado por 49 famílias mutantes e BR IRGA 409 (DRclb = 82,46%). Neste grupo a clorofila b variou de 88,04 % (família 65) até 52,7 % (família 40). As famílias dos grupos A e B apresentaram clorofila b significativamente superior a BRS Querência, estabelecendo a hipótese da possibilidade de ter ocorrido alterações benéficas das constituições genéticas dos indivíduos, quando se utiliza o agente mutagênico.

A deterioração da clorofila é atribuída principalmente ao dano oxidativo, sendo que esse dano limita o fluxo de elétrons (PINTO *et al.*, 2016; STEIN *et al.*, 2009), implicado na limitação estomática na fotossíntese e a consequente redução do crescimento (PEREIRA *et al.*, 2013). Em trabalhos desenvolvidos avaliando-se a resposta ao estresse por ferro em plantas, observou-se que a clorofila b, é a mais sensível aos danos proporcionados pela geração de espécies reativas de oxigênio,

no qual, pode resultar em uma fotoinibição. De fato, as cultivares mais sensíveis apresentaram maior sensibilidade à fotoinibição (PEREIRA *et al.*, 2013).

As variáveis fotossintéticas avaliadas, mediante clorofilômetro, apresentam uma estreita relação com o teor de ferro na parte aérea, permitindo o monitoramento do estresse em tempo real (PEREIRA *et al.*, 2013). É provável que nos grupos A e B superiores à BRS Querência, a prevenção da degradação da clorofila esteja ligada à ativação de mecanismos antioxidantes, a indução da síntese de ferritina e a homeostase do ferro.

Tabela 9 - Desempenho relativo da variável índice de clorofila b (DR clb) de 92 famílias mutantes e as testemunhas BRS Querência, BR IRGA 409 e Epagri 108. CGF/FAEM/UFPel, 2021.

Desempenho relativo do índice de clorofila b (%)												
Grupo	Maior média	Menor média	Famílias M <sub>8</sub> (ordem decrescente de acordo com a média)									
A	144,46	144,46	26									
B	116,09	106,83	7	20	25	23	66					
C	105,31	88,43	5	91	21	3	84	75	19	63	43	36
			59	38	41	1	68	9	64	28	BRQ	85
			39	71	81	4	108	18	10	34	12	67
			22	14	79	51	30	24	31	92	29	
D	88,04	52,7	65	72	55	80	32	44	53	76	15	62
			13	47	46	86	52	33	74	409	57	35
			87	16	90	69	88	37	70	49	50	82
			8	77	48	6	17	89	73	11	83	56
			45	61	58	42	78	54	27	2	60	40

\* Famílias pertencentes ao mesmo grupo não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade de erro. Testemunhas: **93** (Epagri 108, DR clb (%) = 91,76); **94** (BR IRGA 409, DR clb (%) = 82,46); **95** (BRS Querência, DR clb (%) = 93,83).

Para a variável mancha foliar, as famílias foram ordenadas em três grupos pelo teste de agrupamento de médias de Scott-Knott (Tabela 10). No grupo A, nove famílias apresentaram manchas superiores a BRS Querência, incluindo BR IRGA 409 (DRmf = 521,71 %), sendo que o DR variou de 641,67 % (família 44) a 486,51 % (família 47). O sintoma foi marcante, e teve início no ápice da folha, e se expandiu progressivamente em genótipos sensíveis até a região média do limbo, possivelmente a toxidez por ferro foi associada ao colapso das células. O grupo B apresentou 23 famílias mutantes, e as cultivares BRS Querência (DRmf = 386,15%) e Epagri 108 (DRmf = 380,78 %), sendo relatada como tolerante a toxidez indireta ao ferro. A cultivar Epagri 108 quando exposta ao excesso de ferro em meio de crescimento líquido artificial, apresenta uma maior tolerância a variável bronzeamento (QUINET *et al.*, 2012; WU *et al.*, 2014). WU *et al.* (2014) avaliando

mutantes conduzidos em solução hidropônica quanto à toxidez por ferro, verificaram mutantes promissores, com reduzido bronzeamento, destacando essa variável como fundamental para uma triagem inicial. Os resultados evidenciaram redução das manchas em alguns genótipos avaliados, destacando-se o grupo C com 60 famílias mutantes com manchas inferiores a cultivar BRS Querência. Essa característica pode ser útil no melhoramento adaptativo para ambientes tóxicos de ferro. Este caráter está fortemente relacionado com a toxidez por ferro, causado por um aumento na oxidação de polifenóis, em folhas com níveis de ferro acima de 300 mg kg<sup>-1</sup> (SAIKIA; BARUAH, 2012; MÜLLER *et al.*, 2015).

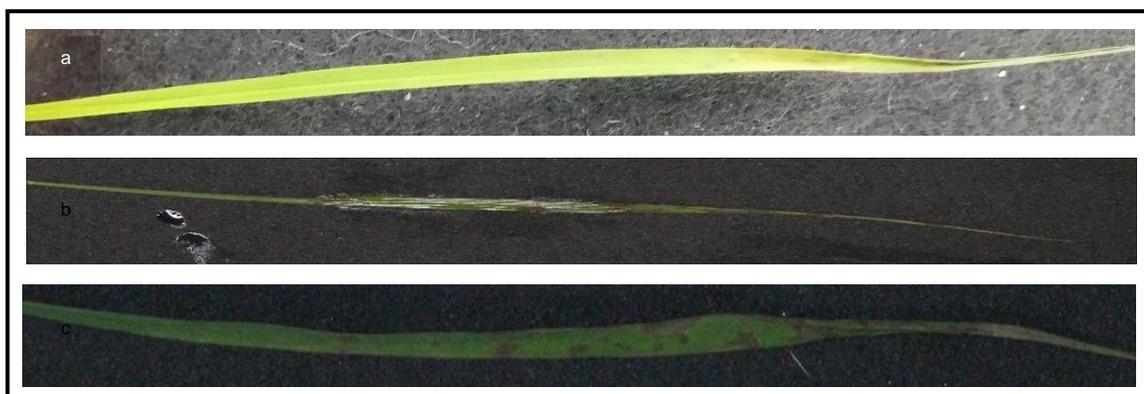
Tabela 10 - Desempenho relativo da variável mancha foliar (DR mf) de 92 famílias mutantes e as testemunhas BRS Querência, BR IRGA 409 e Epagri 108. CGF/FAEM/UFPEL, 2021.

Desempenho relativo de mancha foliar (%)												
Grupo	Maior média	Menor Média	Famílias M <sub>8</sub> (ordem decrescente de acordo com a média)									
A	641,67	486,51	44	69	21	57	50	78	409	58	40	47
			54	85	86	74	52	34	45	62	67	46
			59	55	92	61	79	82	56	32	73	BRQ
B	474,81	380,16	70	89	65	108	75					
			68	72	3	53	91	5	28	76	19	87
			90	10	20	22	60	9	1	48	77	80
C	373,98	204,76	63	38	64	83	27	39	16	13	25	6
			17	37	11	49	81	71	30	88	41	8
			12	31	84	23	14	4	15	51	43	18
			2	7	66	42	29	35	36	26	33	24

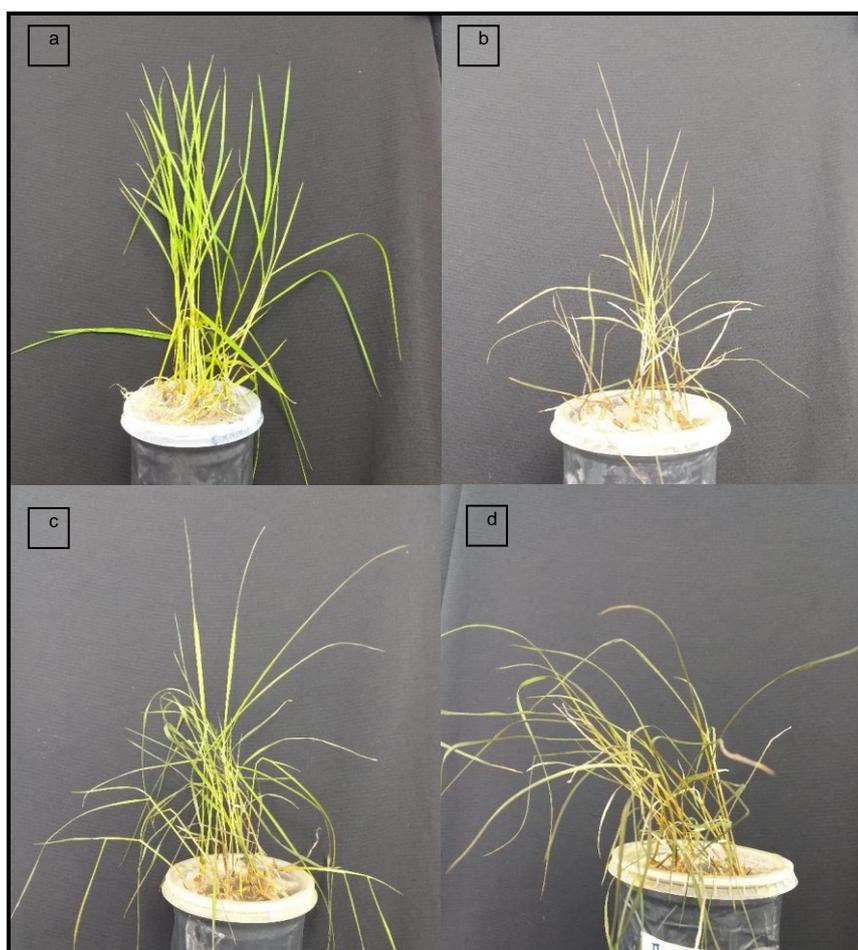
\* Famílias pertencentes ao mesmo grupo não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade de erro. Testemunhas: **93** (Epagri 108, DR mf (%) = 380,78); **94** (BR IRGA 409, DR mf (%) = 521,71); **95** (BRS Querência, DR mf (%) = 386,15).

De maneira geral, considerando todos os resultados desse estudo, foram identificadas três famílias mutantes promissoras, devido ao seu bom desempenho frente ao estresse por ferro em comparação com a testemunha BRS Querência. São estas: as famílias mutantes 3, 5 e 1. Elas foram escolhidas por terem um bom comportamento para todas as variáveis exceto para o comprimento de raiz. Com desempenho igual ou superior a BRS Querência, também foram observadas outras famílias promissoras. Sendo estas, a família mutante 26, com desempenho igual ou superior a BRS Querência para todas as variáveis exceto para comprimento de raiz e comprimento de parte aérea, e a família mutante 7, com desempenho igual ou superior a BRS Querência para todas as variáveis com exceção da clorofila a comprimento de raiz e matéria seca de raiz. Foi possível verificar diferenças visuais,

na parte aérea das plantas, entre as testemunhas quando submetidas à condição de estresse por ferro (Figura 1, 2).



**Figura 1** – Bronzeamento foliar (mancha) por estresse por ferro nas cultivares (a) Epagri 108 (superior), (b) BR IRGA 409 (centro) e (c) BRS Querência (inferior), demonstrando sintomas quando submetidas por 14 dias a  $400 \text{ mg L}^{-1} \text{ Fe}^{2+}$  ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), apresentando um desenvolvimento de 28 dias após germinação.



**Figura 2** – Diferenças na parte aérea das cultivares (a) BRS Querência - controle, (b) BRS Querência – estresse, (c) Epagri 108 – estresse e (d) BR IRGA 409 – estresse, na condição de estresse por ferro por 14 dias a  $400 \text{ mg L}^{-1} \text{ Fe}^{2+}$  ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), apresentando um desenvolvimento de 28 dias após germinação.

### 3.4 CONCLUSÕES

Existe variabilidade genética nas famílias mutantes avaliadas para a tolerância ao estresse por excesso de ferro.

A metodologia utilizada foi efetiva na discriminação dos genótipos quanto a tolerância a toxidez por ferro.

Foram identificadas três famílias mutantes M8 (3, 5 e 1) superiores quanto ao seu desempenho frente a toxidez por excesso de ferro para maioria dos caracteres avaliados.

### REFERÊNCIAS

AFZAL, Shadma *et al.* A comparative screening of abiotic stress tolerance in early flowering rice mutants. **Journal of Biotechnology**, v. 302, p. 112-122, 2019.

AMETA, Rakshita *et al.* Fenton and photo-fenton processes. In: **Advanced oxidation processes for waste water treatment**. Academic Press, p. 49-87, 2018

ANA. Agência Nacional de Águas e Saneamento Básico (Brasil); CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Mapeamento do arroz irrigado no Brasil**, Brasília, 2020.

APEL, Klaus; HIRT, Heribert. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annu. Rev. Plant Biol.**, 2004, v. 55, p. 373-399.

AUDEBERT, Alain; FOFANA, Mamadou. Rice yield gap due to iron toxicity in West Africa. **Journal of Agronomy and Crop Science**, v. 195, n. 1, p. 66-76, 2009.

AUNG, May Sann; MASUDA, Hiroshi. How does rice defend against excess iron?: Physiological and molecular mechanisms. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, 2020.

AUNG, May Sann *et al.* Nicotianamine synthesis by OsNAS3 is important for mitigating iron excess stress in rice. *Frontiers in plant science*, v. 10, p. 660, 2019.

AUNG, May Sann, *et al.* Physiological and transcriptomic analysis of responses to different levels of iron excess stress in various rice tissues. *Soil Science and Plant Nutrition*, v. 64, no 3, p. 370-385, 2018

BACHA, R. E.; YOKOYAMA, S.; ISHIY, T. Induced mutations as a method of obtaining iron toxicity resistant and high quality rice cultivars. In: *Mutations, In Vitro and Molecular Techniques for Environmentally Sustainable Crop Improvement*. Springer, Dordrecht, p. 175-182, 2002

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, n. 1, p. 137-147, 1998.

BECKER, Mathias; ASCH, Folkard. Iron toxicity in rice—conditions and management concepts. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v. 168, n. 4, p. 558-573, 2005.

BIERSCHENK, Birgit *et al.* Evaluation of rice wild relatives as a source of traits for adaptation to iron toxicity and enhanced grain quality. **PloS one**, v. 15, n. 1, p. e0223086, 2020.

BODE, K. *et al.* The role of active oxygen in iron tolerance of rice (*Oryza sativa* L.). **Protoplasma**, v. 184, n. 1, p. 249-255, 1995.

BOFFO, Elisangela F. *et al.* Classification of Brazilian vinegars according to their <sup>1</sup>H NMR spectra by pattern recognition analysis. **LWT-Food Science and Technology**, v. 42, n. 9, p. 1455-1460, 2009.

CAMPELLO, Ricardo JGB *et al.* Hierarchical density estimates for data clustering, visualization, and outlier detection. **ACM Transactions on Knowledge Discovery from Data (TKDD)**, v. 10, n. 1, p. 1-51, 2015.

CARVALHO, FIF de; LORENCETTI, Claudir; BENIN, Giovani. Estimativas e implicações da correlação no melhoramento vegetal. Pelotas: UFPel, v. 142, 2004.

CHE, Jing; YAMAJI, Naoki; MA, JianFeng. Role of a vacuolar iron transporter *OsVIT2* in the distribution of iron to rice grains. **New Phytologist**, 2021.

CHEANEY, Robert L. *et al.* **Field problems of rice in Latin America**. Field problems of rice in Latin America., n. GE 15, 1975.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. Levantamentos da safra brasileira de grãos (safra 2020/21). Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos/boletim-da-safra-de-graos>. Acesso - Mar 2021.

CORTÉS, Diana Carolina Leiva. **Tolerância ao alumínio em cultivares de arroz (*Oryza sativa* L.) colombianos e brasileiros**. 2018. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pelotas.

CURIE, Catherine, *et al.* Metal movement within the plant: contribution of nicotianamine and yellow stripe 1-like transporters. **Annals of botany**, v. 103, no 1, p. 1-11. 2009.

DA LUZ, Viviane Kopp *et al.* Mutation Breeding for Rice Grain Quality: Aspects, Considerations, and Promising Results. In: **The Future of Rice Demand: Quality Beyond Productivity**. Springer, Cham, p. 349-368, 2020.

DANIELSSON, Per-Erik. Euclidean distance mapping. **Computer Graphics and**

**image processing**, v. 14, n. 3, p. 227-248, 1980.

DEMŠAR, Janez et al. Orange: data mining toolbox in Python. **The Journal of Machine Learning Research**, v. 14, n. 1, p. 2349-2353, 2013.

DO AMARAL, Marcelo Nogueira et al. Comparative transcriptomics of rice plants under cold, iron, and salt stresses. **Functional & Integrative Genomics**, v. 16, n. 5, p. 567-579, 2016.

DOBERMANN, Achim. **Rice: Nutrient disorders & nutrient management**. Int. Rice Res. Inst., 2000.

DOS SANTOS, Martielly S. et al. Silicon nutrition mitigates the negative impacts of iron toxicity on rice photosynthesis and grain yield. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 189, p. 110008, 2020.

DUFEY, Inès et al. Novel QTLs in an interspecific backcross *Oryza sativax Oryza glaberrima* for resistance to iron toxicity in rice. **Euphytica**, v. 204, n. 3, p. 609-625, 2015.

DUNN, Kevin. Process Improvement Using Data. Release 3ce778 p,421. 2021. E-book, p. 325. Disponível em:<<https://learnche.org/pid/contents>>. Acessado em 03 de agosto de 2021.

ELEC, Venus et al. Maintaining elevated Fe<sup>2+</sup> concentration in solution culture for the development of a rapid and repeatable screening technique for iron toxicity tolerance in rice (*Oryza sativa* L.). **Plant and soil**, v. 372, n. 1-2, p. 253-264, 2013.

ELMORE, Kimberly L.; RICHMAN, Michael B. Euclidean distance as a similarity metric for principal component analysis. **Monthly weather review**, v. 129, n. 3, p. 540-549, 2001.

FAGERIA, N. K. et al. Iron toxicity in lowland rice. **Journal of Plant Nutrition**, v. 31, n. 9, p. 1676-1697, 2008.

FANG, Wei-Ching et al. Iron induction of lipid peroxidation and effects on antioxidative enzyme activities in rice leaves. **Plant Growth Regulation**, v. 35, n. 1, p. 75-80, 2001.

FAO/OIEA. Mutation breeding manual – Third edition. Spencer-Lopes, M.M., Forster, B.P. y Jankuloski, L. (coords.), Viena, FAO. 2021.

FAO/IAEA-MVD. Food and agriculture organization of the United Nations/International atomic energy agency – mutant variety database. Available online: <https://mvd.iaea.org/#!Search> . Acessado em 3 maio de 2021.

FAOSTAT. 2021. **FAO Statistical Databases**. Disponível online em <http://apps.fao.org/>. Acessado em 24 de março de 2021.

FINATTO, Taciane, et al. Abiotic stress and genome dynamics: specific genes and

transposable elements response to iron excess in rice. **Rice**, vol. 8, no 1, p. 1-18, 2015

GHIMIRE, Raju; WEN-CHI, HUANG; SHRESTHA, RudraBahadur. Factors affecting adoption of improved rice varieties among rural farm households in Central Nepal. **Rice Science**, v. 22, n. 1, p. 35-43, 2015.

GRAHAM, Robin D.; WELCH, Ross M. Plant food micronutrient composition and human nutrition. **Communications in soil science and plant Analysis**, vol. 31, no 11-14, p. 1627-1640.2000.

HAIR, Joseph F. *et al.* **Análise multivariada de dados**. Bookman editora, 2009.

HORI, Tomoyuki *et al.* Identification of iron-reducing microorganisms in anoxic rice paddy soil by 13 C-acetate probing. **The ISME journal**, v. 4, n. 2, p. 267-278, 2010.

HUANG, Sheng *et al.* Nutrição de plantas para nutrição humana: dicas da pesquisa em arroz e perspectivas futuras. **Molecular Plant**, v. 13, n. 6, pág. 825-835, 2020.

INOUE, Haruhiko *et al.* Rice *OsYSL15* is an iron-regulated iron (III)-deoxymugineic acid transporter expressed in the roots and is essential for iron uptake in early growth of the seedlings. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 6, p. 3470-3479, 2009.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatísticas, IBGE, "Levantamento Sistemático da produção agrícola," <https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9201-levantamento-sistemico-da-producao-agricola.html>, acessado em março de 2021

IRRI, SES. Standard Evaluation System. International **Rice Research Institute, Manila, Philippines**, p. 11-30, 2002.

ISHIY, Takazi *et al.* SCS 114 Andosan—primeira variedade mutante de arroz irrigado do Brasil. **Agropecuária Catarinense**, v. 18, n. 3, p. 87-90, 2005.

JANSEN, B.; NIEROP, K. G. J.; VERSTRATEN, J. M. Mobilization of dissolved organic matter, aluminium and iron in podzoleluvial horizons as affected by formation of metal-organic complexes and interactions with solid soil material. **European Journal of Soil Science**, v. 55, no 2, p. 287-297, 2004

KÄMPF, N.; CURI, N. Óxidos de ferro: indicadores de ambientes pedogênicos e geoquímicos. **Tópicos em ciência do solo**, v. 1, p. 107-138, 2000.

KASSAMBARA, Alboukadel. **Practical guide to cluster analysis in R: Unsupervised machine learning**. Sthda, 2017.

KWAN, Wai P.; VOELKER, Bettina M. Rates of hydroxyl radical generation and organic compound oxidation in mineral-catalyzed Fenton-like systems. **Environmental Science & Technology**, v. 37, no 6, p. 1150-1158. 2003

LEE, Sichulet *et al.* Disruption of *OsYSL15* leads to iron inefficiency in rice plants. **Plant**

**Physiology**, v. 150, n. 2, p. 786-800, 2009.

LIMA, H. N. *et al.* Mineralogy and chemistry of three soils along a topossequence from the Upper Solimões Basin, western Amazonia. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 30, n. 1, p. 59-68, 2006.

LINDSAY, W. L. Iron oxide solubilization by organic matter and its effect on iron availability. In: **Iron nutrition and Interactions in Plants**. Springer, Dordrecht, p. 29-36, 1991

LIU, Houjun *et al.* Influence and interaction of iron and cadmium on photosynthesis and antioxidative enzymes in two rice cultivars. **Chemosphere**, v. 171, p. 240-247, 2017.

LIU, Huan *et al.* QTL underlying iron and zinc toxicity tolerances at seedling stage revealed by two sets of reciprocal introgression populations of rice (*Oryza sativa* L.). **The Crop Journal**, v. 4, n. 4, p. 280-289, 2016.

LO, Shuen Fang, *et al.* Genetic resources offer efficient tools for rice functional genomics research. **Plant, Cell & Environment**, 2016, vol. 39, no 5, p. 998-1013.

LOPES, S. I. G.; WEILER, R. L.; LOPES, Mara Cristina Barbosa; FREITAS, P. R.; COMERETO, R. C. **Avaliação da reação a toxidez por excesso de ferro no solo em genótipos de arroz irrigado do Instituto Ríó Grandense do Arroz, Safra 2014/15**. Em: IX Congresso Brasileiro de Arroz Irrigado, 2015, Pelotas. IX Congresso Brasileiro de Arroz Irrigado-Ciência e Tecnologia para otimização da orizicultura. p. 92-96, 2015.

LUZ, Viviane Kopp da *et al.* Identification of variability for agronomically important traits in rice mutant families. **Bragantia**, v. 75, n. 1, p. 41-50, 2016.

MAHENDER, A., SWAMY, B., ANANDAN, A., ALI, J. (2019): Tolerance of iron-deficient and toxic soil conditions in rice. **Plants** 8: 1-34, 2019.

MAIONE, Camila; BARBOSA, Rommel Melgaço. Recent applications of multivariate data analysis methods in the authentication of rice and the most analyzed parameters: A review. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 59, n. 12, p. 1868-1879, 2019.

MATTHUS, Elsa *et al.* Loci, genes, and mechanisms associated with tolerance to ferrous iron toxicity in rice (*Oryza sativa* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 128, n. 10, p. 2085-2098, 2015.

MOHIBULLAH, Md; HOSSAIN, Md Zakir; HASAN, Mahmudul. Comparison of euclidean distance function and manhattan distance function using k-medoids. **International Journal of Computer Science and Information Security**, v. 13, n. 10, p. 61, 2015.

MORI, Satoshi. Iron transport in graminaceous plants. **Metal ions in biological systems**, vol. 35, p. 215-238.1998.

MÜLLER, Caroline *et al.* Ecophysiological responses to excess iron in lowland and upland rice cultivars. **Chemosphere**, v. 189, p. 123-133, 2017.

MÜLLER, Caroline *et al.* Differential physiological responses in rice upon exposure to excess distinct iron forms. **Plant and Soil**, v. 391, n. 1, p. 123-138, 2015.

MURGIA, Irene; DELLEDONNE, Massimo; SOAVE, Carlo. Nitric oxide mediates iron-induced ferritin accumulation in Arabidopsis. **The Plant Journal**, v. 30, n. 5, p. 521-528, 2002.

NUGRAHA, Yudhistira *et al.* Nutrient culture media with agar is effective for early and rapid screening of iron toxicity tolerance in rice. **Journal of Crop Science and Biotechnology**, v. 19, n. 1, p. 61-70, 2016.

OLKIN, Ingram; SAMPSON, Allan R. Multivariate analysis: overview. 2001.

ONAGA, Geoffrey *et al.* Morphological and genetic diversity analysis of rice accessions (*Oryza sativa* L.) differing in iron toxicity tolerance. **Journal of Crop Science and Biotechnology**, v. 16, n. 1, p. 53-62, 2013.

ONYANGO, Dorothy A. *et al.* Mechanistic understanding of iron toxicity tolerance in contrasting rice varieties from Africa: 1. Morpho-physiological and biochemical responses. **Functional Plant Biology**, v. 46, n. 1, p. 93-105, 2019.

PATHIRANA, R. *et al.* Selection of rice for iron toxicity tolerance through irradiated caryopsis culture. **Plant cell, tissue and organ culture**, v. 70, n. 1, p. 83-90, 2002.

PAWAR, S., *et al.* Population genetic structure and association mapping for iron toxicity tolerance in rice. **PloS one**, vol. 16, no 3, p. e0246232, 2021.

PENG, Yu Yang, *et al.* Magnesium deficiency triggers SGR-mediated chlorophyll degradation for magnesium remobilization. **Plant Physiology**, vol. 181, no 1, p. 262-275, 2019.

PEREIRA, Eduardo Gusmão *et al.* Iron excess affects rice photosynthesis through stomatal and non-stomatal limitations. **Plant Science**, v. 201, p. 81-92, 2013.

PINTO, Samuel de Souza *et al.* Oxidative damage and photosynthetic impairment in tropical rice cultivars upon exposure to excess iron. **Scientia Agricola**, v. 73, n. 3, p. 217-226, 2016.

PONNAMPERUMA, Felix N. The chemistry of submerged soils. In: **Advances in Agronomy**. Academic Press. p. 29-96. 1972

PRADHAN, S. K. *et al.* Genetic regulation of homeostasis, uptake, bio-fortification and efficiency enhancement of iron in rice. **Environmental and Experimental Botany**, p. 104066, 2020.

QU, Dong; RATERING, S.; SCHNELL, S. Microbial reduction of weakly crystalline

iron (III) oxides and suppression of methanogenesis in paddy soil. **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, vol. 72, no 6, p. 1172-1181, 2004

RODEN, Eric E., *et al.* Extracellular electron transfer through microbial reduction of solid-phase humic substances. **Nature Geoscience**, v. 3, no 6, p. 417-421. 2010

QUINET, Muriel *et al.* Combined transcriptomic and physiological approaches reveal strong differences between short-and long-term response of rice (*Oryza sativa*) to iron toxicity. **Plant, Cell & Environment**, v. 35, n. 10, p. 1837-1859, 2012.

RAINA, Aamir; KHAN, Samiullah. Increasing rice grain yield under biotic stresses: mutagenesis, transgenics and genomics approaches. In: **Rice Research for Quality Improvement: Genomics and Genetic Engineering**. Springer, Singapore, p. 149-178.2020

RAMIREZ, Leonor, *et al.* Nitric oxide, nitrosyl iron complexes, ferritin and frataxin: a well equipped team to preserve plant iron homeostasis. **Plant Science**, vol. 181, no 5, p. 582-592.2011.

RUENGPAYAK, Siriphat *et al.* Forward screening for seedling tolerance to Fe toxicity reveals a polymorphic mutation in ferric chelate reductase in rice. **Rice**, v. 8, n. 1, p. 1-10, 2015.

RUTLEDGE, Douglas N.; BOUVERESSE, D. Jouan-Rimbaud. Independent components analysis with the JADE algorithm. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 50, p. 22-32, 2013.

SAHRAWAT, K. L. Elemental composition of the rice plant as affected by iron toxicity under field conditions. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 31, n. 17-18, p. 2819-2827, 2000.

SAHRAWAT, K. L. Iron toxicity in wetland rice and the role of other nutrients. **Journal of Plant Nutrition**, v. 27, n. 8, p. 1471-1504, 2005.

SAIKIA, T.; BARUAH, K. K. Iron toxicity tolerance in rice (*Oryza sativa*) and its association with anti-oxidative enzyme activity. **Journal of Crop Science**, v. 3, n. 3, p. 90, 2012.

SAITO, Kazuki, *et al.* Yield-limiting macronutrients for rice in sub-Saharan Africa. **Geoderma**, vol. 338, p. 546-554, 2019

SANTIAGO, C. M.; BRESEGHELLO, HC de P.; FERREIRA, C. M. **Arroz: o produtor pergunta, a Embrapa responde**. Brasília, DF: Embrapa, 2013.

SCHMIDT, Fabiana *et al.* The impact of water management on iron toxicity in flooded rice. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 37, n. 5, p. 1226-1235, 2013.

SCOTT, A. J.; KNOTT, M. A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, Washington, v. 30, n. 3, p. 507-512, 1974.

SEBASTIAN, Abin; PRASAD, M. N. V. Exogenous citrate and malate alleviate cadmium stress in *Oryza sativa* L.: Probing role of cadmium localization and iron nutrition. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 166, p. 215-222, 2018.

SERRAT, Xavier *et al.* EMS mutagenesis in mature seed-derived rice calli as a new method for rapidly obtaining TILLING mutant populations. **Plant Methods**, v. 10, n. 1, p. 1-14, 2014.

SIKIROU, Mouritala *et al.* Genetic improvement of iron toxicity tolerance in rice-progress, challenges and prospects in West Africa. **Plant Production Science**, v. 18, n. 4, p. 423-434, 2015.

SILVA, Leandro Souza da; RANNO, Sidnei Küster. Calagem em solos de várzea e a disponibilidade de nutrientes na solução do solo após o alagamento. **Ciência Rural**, v. 35, n. 5, p. 1054-1061, 2005.

SILVEIRA, Vivian C. da *et al.* Influence of iron on mineral status of two rice (*Oryza sativa* L.) cultivars. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 19, n. 2, p. 127-139, 2007.

SOSBAI- Sociedade Sul-Brasileira de Arroz Irrigado. **Arroz irrigado: Recomendações Técnicas da Pesquisa para o Sul do Brasil**. Cachoeirinha: SOSBAI, 2018. 205p. 2018.

SOUSA, R.O. ; GOMES, A da S ; VAHL, L. C. . Toxidez por ferro em arroz irrigado. In: GOMES, A.S.; MAGALHÃES Jr, A.. (Org.). **Arroz Irrigado no Sul do Brasil. 1ed.**Brasília: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, p. 305-337. 2004.

SOUZA, Tatiane Medeiros *et al.* Efeito do Fe<sup>2+</sup> sobre parâmetros de crescimento de genótipos de arroz em condição de campo. In: XVII CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E X ENCONTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO, 2008, Pelotas, 2008.

SOUZA, Tatiane Medeiros. **Caracterização de RILs (Recombinant inbred lines) eduplo-haploides de arroz (*Oryza sativa* L.) quanto a tolerância ao estresse por ferro utilizando sistema hidropônico e seleção in vitro. 2015.** Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal de Pelotas. 2015

STEIN, Ricardo José; RICACHENEVSKY, Felipe Klein; FETT, Janette Palma. Differential regulation of the two rice ferritin genes (*OsFER1* and *OsFER2*). **Plant Science**, vol. 177, no 6, p. 563-569. 2009

STRUYK, Z.; SPOSITO, Garrison. Redox properties of standard humic acids. **Geoderma**, v. 102, n. 3-4, p. 329-346, 2001.

TADANO, T.; YOSHIDA, Shouichi. Chemical changes in submerged soils and their effect on rice growth. **Soils and Rice**, p. 399-420, 1978.

TADAIESKY, Lorene BA *et al.* Brassinosteroids trigger tolerance to iron toxicity in rice. **Physiologia Plantarum**, v. 171, n. 3, p. 371-387, 2021

TILL, Bradley J. *et al.* Discovery of chemically induced mutations in rice by TILLING. **BMC plant biology**, v. 7, n. 1, p. 1-12, 2007.

VAN OORT, P. A. J. Mapping abiotic stresses for rice in Africa: Drought, cold, iron toxicity, salinity and sodicity. **Field Crops Research**, v. 219, p. 55-75. 2018

VIANA, Vívian Ebeling, *et al.* Mutagenesis in rice: the basis for breeding a new super plant. **Frontiers in plant science**, v. 10, p. 1326. 2019.

VIANA, Vívian Ebeling *et al.* Activation of rice WRKY transcription factors: an army of stress fighting soldiers? **Current Opinion in Plant Biology**, v. 45, p. 268-275, 2018.

VIRMANI, S. S. Varietal tolerance of rice to iron toxicity in Liberia. **Int Rice Res NewslInst Rice Res Inst**, 1977.

WALTER, Melissa; MARCHEZAN, Enio; DE AVILA, Luis Antonio. Arroz: composição e características nutricionais. **Ciência Rural**, v. 38, n. 4, p. 1184-1192, 2008.

WANG, Yunxia; FREI, Michael. Stressed food—The impact of abiotic environmental stresses on crop quality. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 141, n. 3-4, p. 271-286, 2011.

WOLD, Svante; ESBENSEN, Kim; GELADI, Paul. Principal component analysis. **Chemometrics and intelligent laboratory systems**, v. 2, n. 1-3, p. 37-52, 1987.

WU, Lin-Bo *et al.* Potassium ion channel gene *OsAKT1* affects iron translocation in rice plants exposed to iron toxicity. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, p. 579, 2019.

WU, Lin-Bo *et al.* Shoot tolerance mechanisms to iron toxicity in rice (*Oryza sativa*L.). **Plant, Cell & Environment**, v. 40, n. 4, p. 570-584, 2017.

WU, Lin-Bo *et al.* Genetic and physiological analysis of tolerance to acute iron toxicity in rice. **Rice**, v. 7, n. 1, p. 1-12, 2014.

XIAO, Min; WU, Feng chang. A review of environmental characteristics and effects of low-molecular weight organic acids in the surface ecosystem. **Journal of Environmental Sciences**, vol. 26, no 5, p. 935-954, 2014

YOSHIDA, S. **Fundamentals of Rice Crop Science. Los Banos: IRRI, 1981.** IRRI, 1981

YOKOSHO, Kengo; YAMAJI, Naoki; MA, JianFeng. *OsFRDL1* expressed in nodes is required for distribution of iron to grains in rice. **Journal of experimental botany**, v. 67, no 18, p. 5485-5494, 2016.

ZHANG, Lin, *et al.* Excess iron stress reduces root tip zone growth through nitric oxide-mediated repression of potassium homeostasis in Arabidopsis. **New Phytologist**, v. 219, n. 1, p. 259-274, 2018.

## 4 CAPÍTULO II. VARIABILIDADE GENÉTICA EM FAMÍLIAS MUTANTES DE ARROZ DERIVADAS DA CULTIVAR BRS QUERÊNCIA

### 4.1 INTRODUÇÃO

O arroz (*Oryza sativa* L.) é uma das culturas mais importantes em todo o mundo. Dada a importância dessa cultura, novas cultivares melhoradas devem ser constantemente desenvolvidas em programas de melhoramento, o que só é possível enquanto houver variabilidade genética através de novos genes e alelos que controlam características de importância econômica.

O uso intenso de poucos genótipos em blocos de cruzamento após a revolução verde, em 1960, tem causado prejuízos no que diz respeito à variabilidade genética disponível no germoplasma elite de arroz (GOVINDARAJ *et al.*, 2015; BUSANELLO *et al.*, 2020). Uma maneira viável de incorporar resiliência em cultivares de arroz modernas com estreita base genética é gerando variabilidade por meio de mutações. A mutação desempenhou um papel vital na melhoria da produtividade e qualidade das culturas agrícolas, resultando em mais de 3.000 variedades de 175 espécies de plantas, desenvolvidas por meio de mutação induzida direta ou indireta, em todo o mundo (MIR *et al.*, 2020).

Mutantes de arroz, induzidos por EMS, por exemplo, podem ser um recurso valioso de genes para tolerância a múltiplos estresses abióticos (AFZAL *et al.*, 2019). Este método é responsável, também, pelo desenvolvimento da tecnologia Clearfield® (SUDIANTO *et al.*, 2013). O aumento da diversidade genética através da utilização de EMS, tem a vantagem adicional de as linhagens geradas não serem consideradas como organismo geneticamente modificado (OGM), tendo assim uma maior aceitabilidade pelos consumidores.

A cultivar BRS Querência apresenta como características principais, panícula longa (aprox. 30 cm) e ciclo precoce, sendo uma das cultivares modernas fruto de uma série de mudanças nos programas de melhoramento do sul do Brasil, visando o aumento de potencial de rendimento e redução da altura e do ciclo das plantas (STRECK *et al.*, 2018). Posto isto, essa cultivar é um importante ponto de partida para programas de melhoramento visando várias outras características.

A toxidez por excesso de ferro é um problema no cultivo de arroz por inundação. A tolerância à esse fator é de natureza complexa e governada por muitos genes, e frequentemente caracterizada pela importância de alelos de pequeno efeito e/ou raros, distribuídos por todo o genoma (PAWAR *et al.*, 2021; MELANDRI *et al.*, 2020). A, já mencionada, redução da base genética do arroz, é também um entrave para sua adaptação local à toxicidade por Fe (MELANDRI *et al.*, 2020).

É possível constatar o avanço da pesquisa científica, não apenas na descrição das vias regulatórias para tolerância à toxidez por ferro, mas também no melhoramento de variedades elite com foco no germoplasma de arroz do sul do Brasil. Com isso, a caracterização de mutantes derivados da cv. BRS Querência, realizada em sistema hidropônico no capítulo I, terá uma análise diferencial ao submeter os dados a análise multivariada. A análise de componentes principais (PCA) é um procedimento multivariado, que alterna os dados de forma que a variabilidade máxima seja projetada nos eixos. O principal uso do PCA é reduzir a dimensionalidade de um conjunto de dados, enquanto retém o máximo de informações possível. Ele calcula uma descrição compacta e ideal do conjunto de dados em variáveis interpretáveis chamadas de componentes principais (PCs) que são ortogonais (LAVINE; MIRJANKAR, 2000). O primeiro componente principal é a combinação de variáveis que explica a maior quantidade de variação. O segundo componente principal define a próxima maior quantidade de variação e é independente do primeiro componente principal.

No PCA, uma matriz J-dimensional  $X$  ( $I \times J$ ) é projetada em um espaço inferior de dimensão  $R$  decompondo  $X$  em uma matriz de pontuação  $T$  ( $I \times R$ ) e uma matriz de carregamento  $P$  ( $J \times R$ ) cujos modelos de produto a variação sistemática dos dados na equação:

$$x = \sum_{r=1}^R t_r p_r^T + E = TP^T + E$$

Na equação,  $E$  ( $I \times J$ ) é a matriz residual,  $t_r$  é o vetor de pontuação para o  $r$ -ésimo componente e  $p_r$  é o vetor de carregamento para o  $r$ -ésimo componente. Um gráfico de duas colunas da matriz de pontuação em relação ao outro fornece uma projeção bidimensional do conjunto de dados original, enquanto um gráfico de colunas da matriz de carregamento  $P$  exibe a correlação entre as variáveis (BEEBE *et al.*, 1998; BOFFO *et al.*, 2019).

Usado o PCA no conjunto de dados completo, ele refletirá a estrutura de correlação interna em todo o conjunto de dados, permitindo que as variáveis que descrevem os mesmos atributos contrastantes relacionados sejam visualizadas. O PCA pode ser usado para simplificar as visualizações de um grande conjunto de dados e identificar combinações de variáveis que têm a maior contribuição para variações no conjunto de dados, uma vez que essas variáveis são retidas nos primeiros dois ou três componentes (LAVINE; MIRJANKAR, 2006).

Por outro lado, existem os métodos hierárquicos de agrupamento de genótipos baseados em distâncias genéticas pré-calculadas. Esses métodos são sensíveis para determinação do número de grupos e conseguem captar mais eficientemente a existência de acessos discrepantes (FARIA *et al.*, 2012). A variabilidade genética tem sido frequentemente medida com base principalmente em características morfológicas. Como exemplo, a partir de 16 variáveis morfológicas e qualitativas, incluindo teor de ferro, Roy e Sharma (2014), construíram um dendrograma com 84 variedades locais de arroz que apresentaram diversidade genética, agrupando-as em cinco grupos principais. O objetivo deste trabalho foi caracterizar a variabilidade genética de uma população de linhagens mutantes de arroz provenientes da cultivar BRS Querência frente à tolerância ao excesso de ferro.

## 4.2 MATERIAL E MÉTODOS

Foram avaliados um conjunto de 95 genótipos, no qual 92 são famílias mutantes M<sub>8</sub> derivadas da cv. BRS Querência, induzidas com mutagênico químico EMS (etilmetanosulfonato) a 1,5%. As famílias fazem parte do programa do Centro de Genômica e Fitomelhoramento da UFPel (LUZ *et al.*, 2016). Como testemunhas foram utilizadas a cultivar BR IRGA 409, reconhecida como sensível à toxidez por ferro, cultivar. Epagri 108, como tolerante e a cultivar BRS Querência, como moderadamente tolerante à toxidez direta, e, especialmente, cultivar de onde os mutantes foram originados (DO AMARAL *et al.*, 2016; LUZ *et al.*, 2016).

Os dados utilizados nas análises, contém informações relacionadas as variáveis afetadas pela toxidez ao ferro, tais como: percentual de desempenho relativo das variáveis comprimento de parte aérea (DR cpa), comprimento de raiz

(DR cr), matéria seca de parte aérea (DR mspa), matéria seca de raiz (DR msr), índice de clorofila a (DR cla), índice de clorofila b (DR clb) e mancha foliar (DR mf) de 92 famílias mutantes e as testemunhas BRS Querência, BR IRGA 409 e Epagri 108.

Os dados foram submetidos às análises de componentes principais (PCA), agrupamento de K-means, distância genética euclidiana e agrupamento hierárquico UPGMA. Primeiramente, foram normalizados os dados para ajustar os valores à escala comum. Os dados foram submetidos à análise de componentes principais. Procurou-se utilizar o número de componentes que explicasse a maior fração da variação nos dados (acima de 75%), mas que ao mesmo tempo não implicasse em um número muito elevado de componentes, tornando o resultado difícil de ser interpretado. Na sequência, o algoritmo K-means foi aplicado para agrupar os genótipos. O programa Orange v. 3.29.3 foi usado para todas as análises, sendo os resultados demonstrados graficamente (DEMSAR et al., 2013).

Ainda como auxílio do programa Orange, uma matriz de distância genética foi calculada, com base na distância Euclidiana, sendo, na sequência aplicado o método de agrupamento hierárquico UPGMA. Um ponto de corte foi atribuído pela metodologia de Mojena (1997), onde o corte = média +  $K 1,25 * DP$ , cujo cálculo foi feito com o auxílio do programa Genes (CRUZ, 2001). Esta matriz foi também transformada em um mapa de calor, para uma visualização simples e direta das distâncias genéticas entre os genótipos.

### **4.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES**

Inicialmente, foi identificado que três componentes principais (CPs), explicaram acima de 75% da variância total dos dados (PC1 33,2%, PC2 27,8%, PC3 14%), conforme demonstrado na Figura 3.

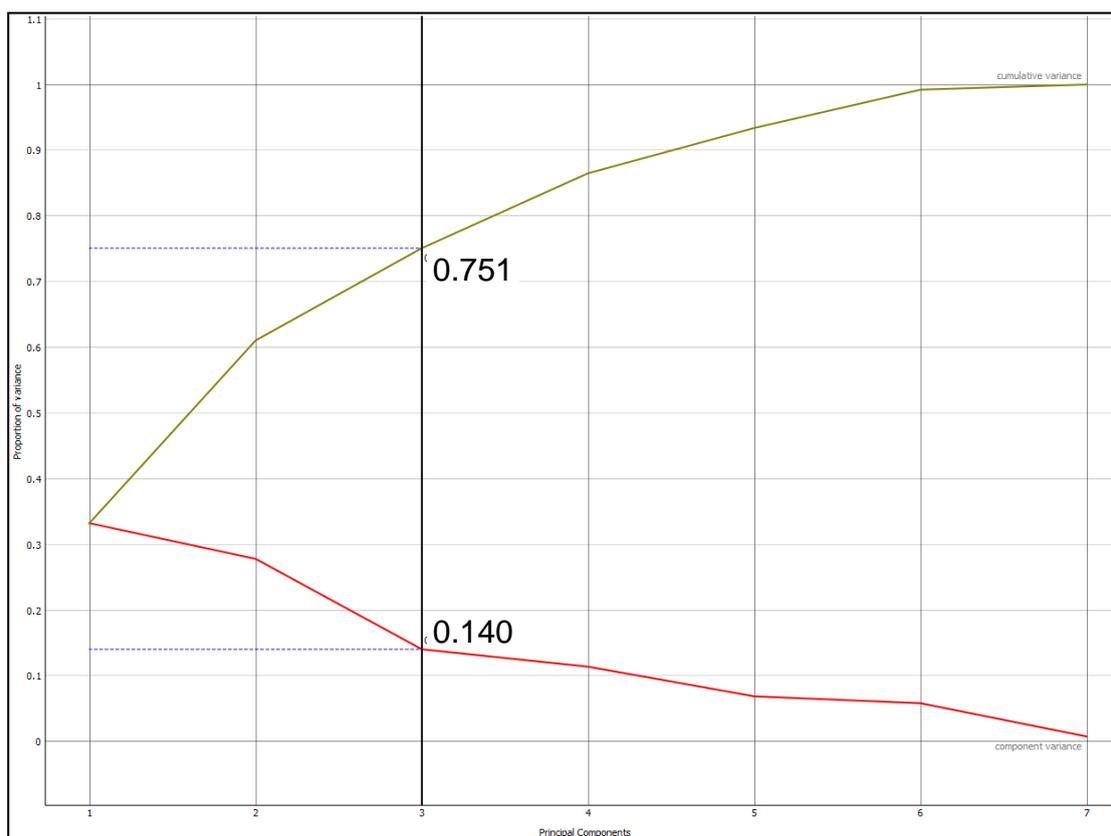


Figura 3- Plano demonstrando a porcentagem da variação genética em relação ao número de componentes principais. A linha vermelha (inferior) mostra a contribuição individual de cada componente e a verde (superior) mostra o efeito acumulado dos mesmos.

Cada variável tem uma importância particular em uma análise multivariada, assim como no PCA, conforme demonstrado na Tabela 11. Na análise de PCA, geralmente poucos componentes explicam boa parte da variação do conjunto de genótipos, o que é positivo, pois muitos eixos (componentes) tornam a análise confusa ou exaustiva. O componente principal CP1, apresenta as informações mais importantes referentes aos mutantes estudados, o qual foi positivo e fortemente associado a DRcl<sub>a</sub> e DRcl<sub>b</sub>. De fato, o estresse por ferro causa graves conseqüências na capacidade fotossintética, no fotosistema II (ZAHRA *et al.*, 2021). Salienta-se que a mutação induzida por EMS é completamente aleatória nos genomas, ou seja, não há controle de quais características serão afetadas (YAN *et al.*, 2021). Com base na avaliação fenotípica, somente é possível sugerir prováveis sítios de mutação, como em genes associados a aumento ou decréscimo em clorofilas a e b, ou ainda mecanismos indiretamente relacionados, como qualquer

fator que possa preservar ou afetar negativamente a integridade das folhas, por exemplo, uma eventual taxa mais rápida de mobilização de ferro (LEE, 2012), e isso é consistente com os trabalhos realizados com cultivares brasileiras (STEIN *et al.*, 2009). As principais variáveis que contribuíram para CP2 foram DRcr e DRcpa. De fato, o estresse por ferro prejudica as variáveis de crescimento e biomassa (KAEWCHEENCHAI *et al.*, 2021). O DR de mancha foi a mais importante variável que contribuiu para o CP3. Isto significa que as variáveis associadas mais fortemente a cada CP, tiveram maior importância para o excesso ao ferro nos genótipos avaliados, e no caso da mancha, uma maior presença de bronzeamento, como no caso do M44.

Em relação à variável de mancha nas folhas, ela está relacionada com a expressão da ferritina, e segundo o estudo de Lucca e colaboradores (2006), as concentrações de ferro nas folhas de plantas de arroz com alta superexpressão de ferritina eram ainda menores que um décimo dos não transformados, que não superexpressam o gene relacionado. O acúmulo de metal nos tecidos vegetativos das plantas pode ser afetado por modificações genéticas, o que é motivador para o melhoramento (WIRTH *et al.*, 2009). É importante mencionar que muitos mutantes podem não apresentar determinados fenótipos importantes em condições normais de crescimento, isto é, algumas diferenças podem ficar imperceptíveis ao olho humano, mas que podem ser úteis, especialmente se combinadas, em estratégias de seleção. Conseqüentemente, esses mutantes precisam ser identificados por triagem em condições apropriadas ou induzíveis, como em hidroponia (LO *et al.*, 2016).

Tabela 11 - Associação dos componentes principais quanto às variáveis avaliadas.

Componentes	DRcpa	DRcr	DRmspa	DRmsr	DRcla	DRclb	DRmancha
CP1	-0,12	0,11	0.36	0.21	0.58	0.57	-0.40
CP2	0,51	0,53	0.39	0.47	-0.19	-0.24	-0.02
CP3	-0,53	-0,21	0.33	0.19	-0.37	-0.35	0.53

Nas Figuras 4 a 6, são apresentados os planos com as combinações dos três componentes principais. A Figura 4 é a mais importante, pois mostra (CP1 X CP2), e as duas figuras restantes a complementam. Em outras palavras, cada combinação de componentes mostra a distribuição dos dados sob um ângulo. Evitou-se plotar uma figura única contendo todas as três dimensões (em 3D), pois acarretaria em

dificuldade para visualizar os resultados claramente. Pode-se observar a formação de três grupos originados da análise de K-means. O primeiro grupo (azul), foi formado por 36 famílias mutantes, incluindo a testemunha BR IRGA 409. O segundo grupo (vermelho), contém 29 famílias mutantes, e BRS Querência. No terceiro grupo (verde), são encontradas 30 famílias mutantes juntamente com a cultivar Epagri 108. As famílias mutantes estudadas têm, de fato, apresentado variação fenotípica sob condições tóxicas de ferro a  $400 \text{ mg L}^{-1} \text{ Fe}^{2+}$ , como demonstrado do capítulo anterior desse trabalho e no Apêndice a. Da mesma forma, as três testemunhas tiveram amplitudes distintas, e como esperado, seus valores extremos foram decisivos para os seus posicionamentos contrastantes na matriz dos componentes principais. Quanto à análise de K-means, a mesma tem a finalidade de definir grupos obedecendo um critério estatístico, e não meramente de forma visual.

Observando, também, cada linhagem individualmente, especialmente tomando a Figura 4, a qual plota os componentes mais informativos, é possível verificar que os mutantes M13 (amarelo), M40 (azul) e M25 e M26 (vermelho), são os mais divergentes, ao comparar com os demais estudados, dado a sua distância na plotagem.

Na Figura 5, observa-se uma tendência ordenada e nítida em relação ao grupo C1 que inclui a BR IRGA 409, estando mais distante dos grupos C2 e C3. Na Figura 6, os mutantes M2, M42, M6, M13 do grupo C3 estão distantes das demais famílias mutantes. Os mutantes M2 e M42, estão fortemente associados ao terceiro CP, cujo principal contribuinte é a variável mancha, com pontuação negativa para esta variável (Apêndice b), o M6 e M13 com pontuação positiva para as variáveis associadas a seu CP, o CP2.

Um certo grau de correspondência foi observado para tolerância à toxicidade de ferro nas testemunhas e grupos, observando-se uma ampla variabilidade genética. Em uma triagem recente de 352 linhagens de arroz, também em hidroponia, foram categorizados três grupos, tolerantes, moderadamente tolerantes e suscetíveis à toxicidade do ferro, e interessante, se associou significativamente a tolerância ao ferro com teor do mesmo em grãos e características de componente de rendimento (PAWAR *et al.*, 2021).

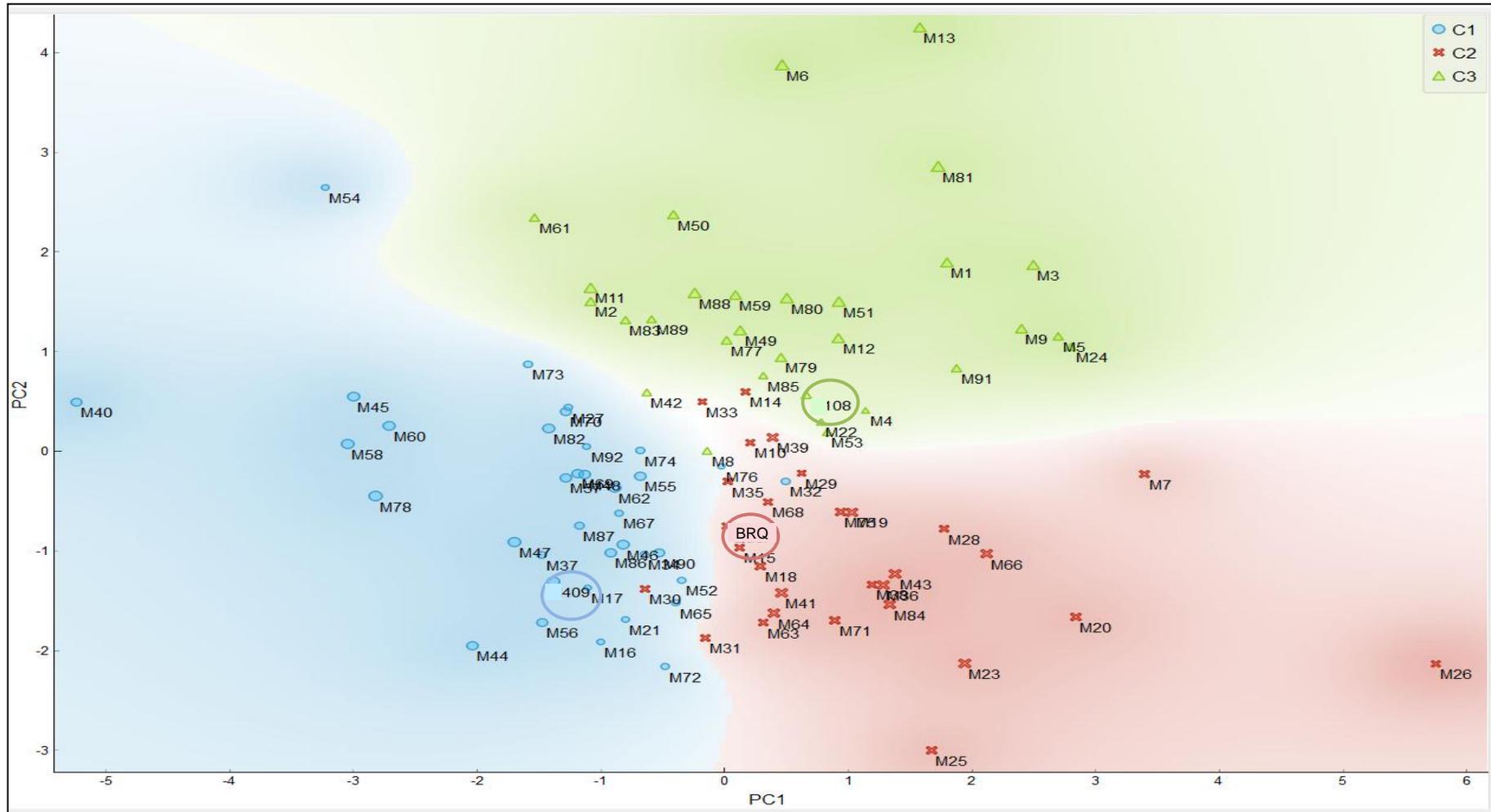


Figura 4- Análise de componentes principais (PC1/PC2) de 92 famílias mutantes  $M_8$  e as cultivares BRS Querência, BR IRGA 409 e Epagri 108. CGF/FAEM/UFPel, 2021.

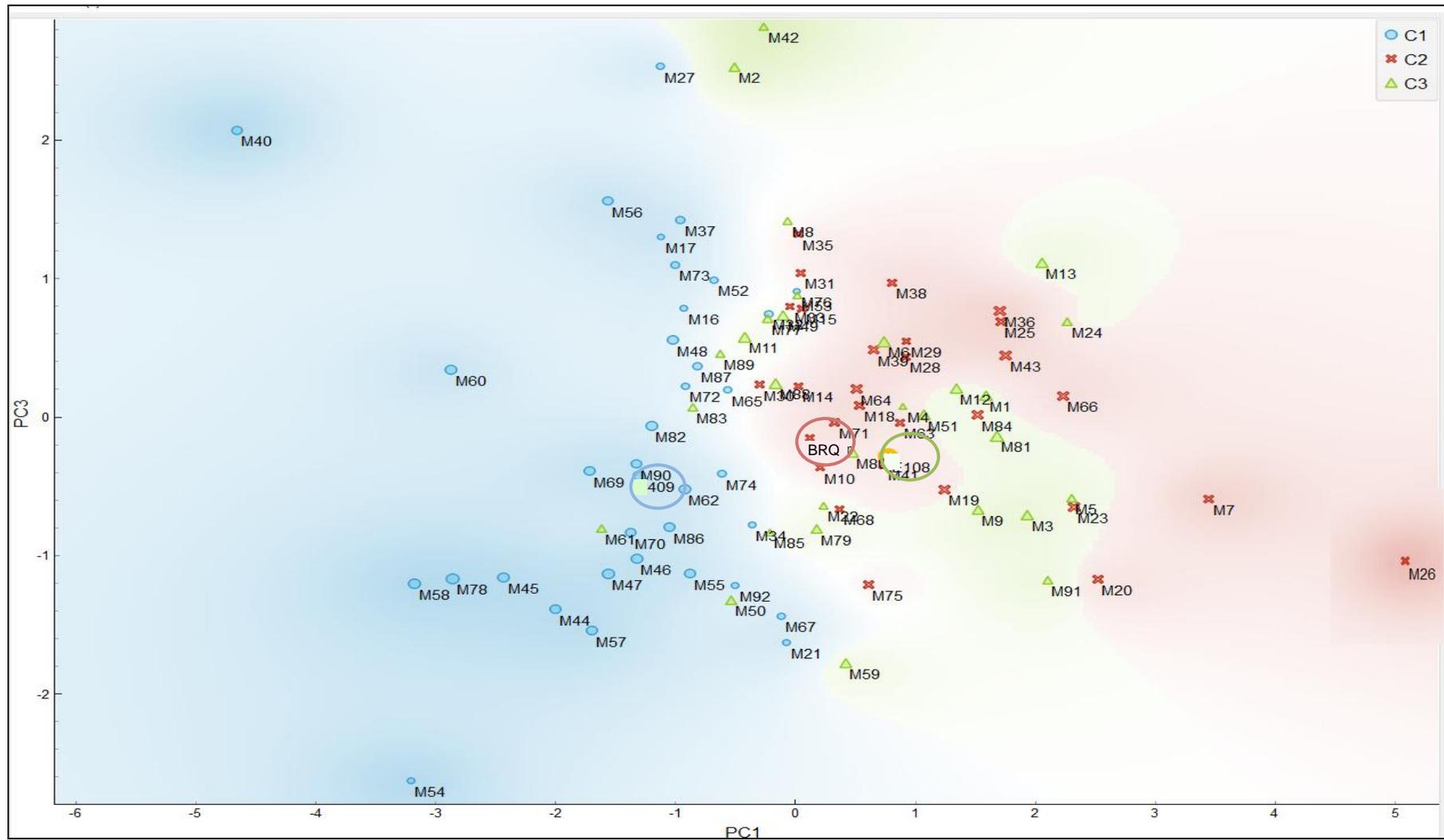


Figura 5- Análise de componentes principais (PC1/PC3) de 92 famílias mutantes M8 e as cultivares BRS Querência, BR IRGA 409 e Epagri 108. CGF/FAEM/UFPel, 2021.

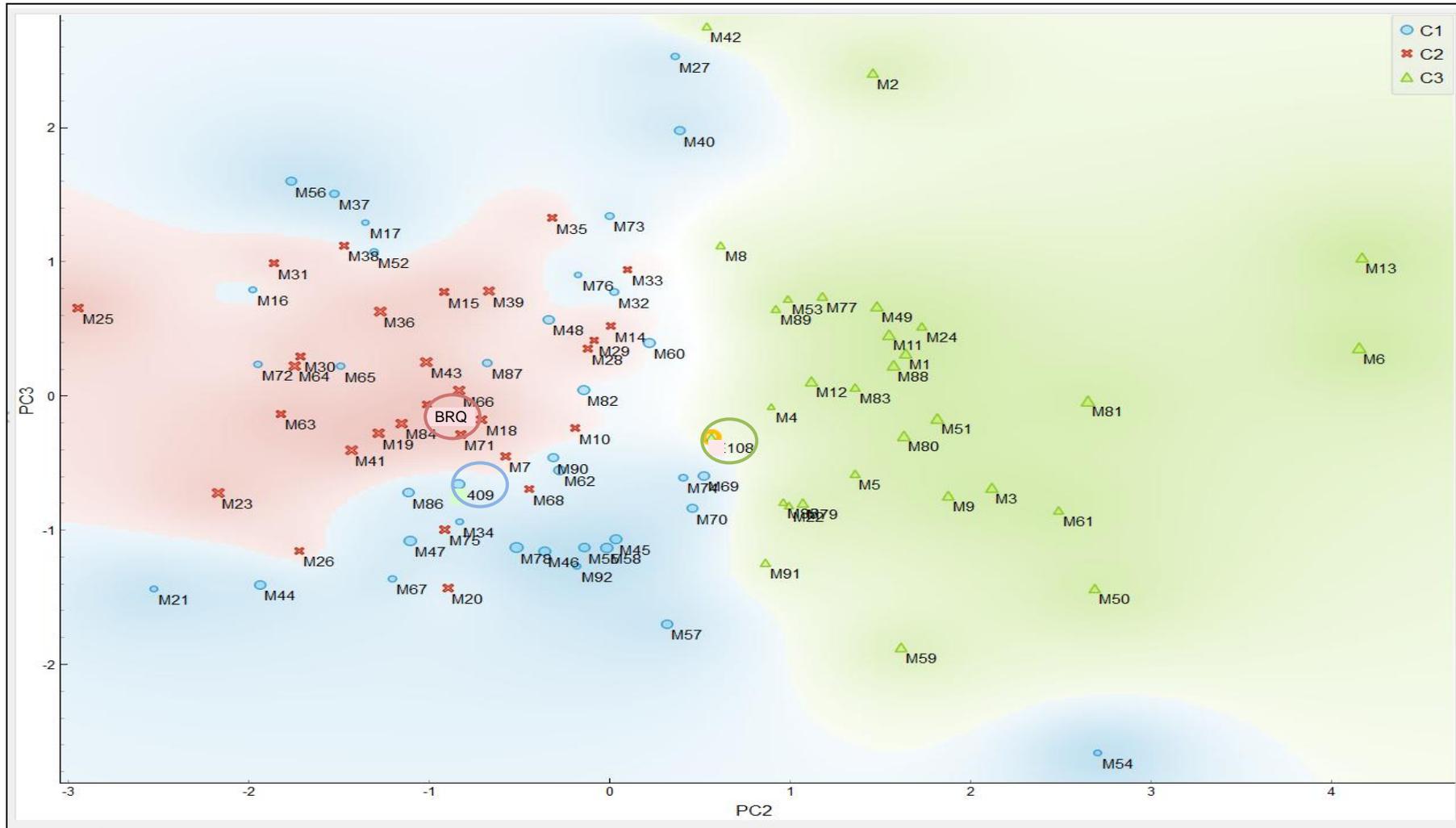


Figura 6- Análise de componentes principais (PC2/PC3) de 92 famílias mutantes M<sub>8</sub> e as cultivares BRS Querência, BR IRGA 409 e Epagri 108. CGF/FAEM/UFPel, 2021.

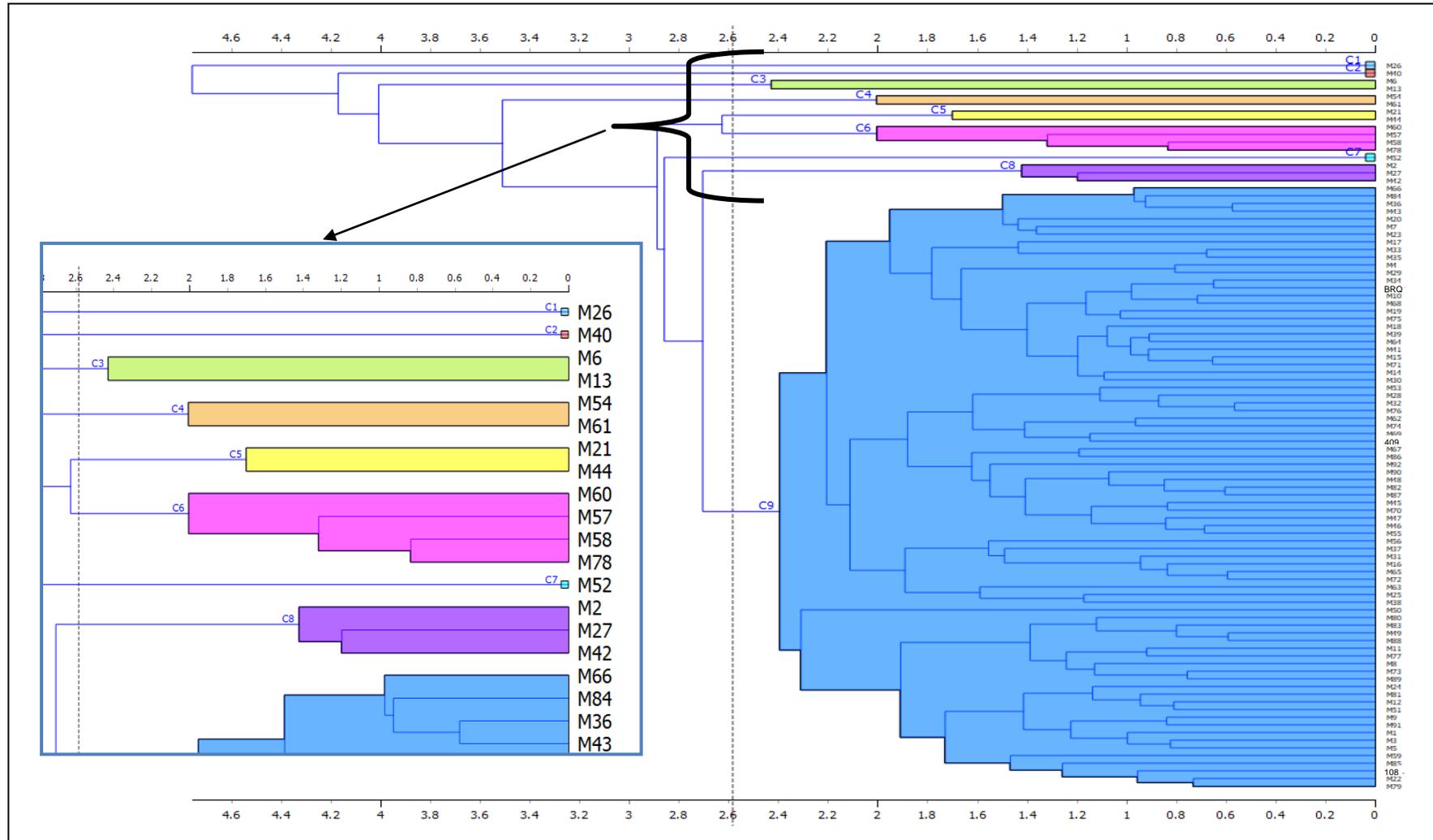


Figura 7- Dendrograma obtido através da análise 92 famílias mutantes M8 e as cultivares BRS Querência, BR IRGA 409 e Epagri 108, pelo método UPGMA, a partir de distância Euclideana. CGF/FAEM/UFPel, 2021.

A análise de agrupamento pelo método UPGMA, baseado na distância Euclidiana, revelou nove grupos de genótipos (Figura 7). Em ordem de tamanho, formaram-se o grupo 1, com o mutante M26, no grupo 2, o M40, o grupo 7 com o mutante M52, o grupo 3 com os mutantes M13 e M6, o grupo 4 com os mutantes M61 e M54, o grupo 5, com os mutantes M44 e M21, o grupo 8 os mutantes M42, M2 e M27 no grupo 6 os mutantes M60, M78, M58 e M57, e, finalmente, um grande grupo com as cultivares BR IRGA 409, Epagri 108 e BRS Querência, e demais mutantes. Assim, chama a atenção que se encontrou uma maior variação entre algumas famílias mutantes do que propriamente entre as testemunhas.

Pode ser de fato confirmado na matriz de distância, no apêndice c, que os mutantes M6 e M13 estão próximos um do outro e separados, relativamente, dos demais mutantes. Também pode ser observado agrupamentos individuais, o grupo C1 (M26) que se encontra perto de M7 (2.105) e longe de M40 (7,93) sendo a maior distância encontrada, o grupo C2(M40) que está perto de M27 (2,640), e o grupo C7(M52) que está perto de M56 (1,986) e longe de M13 (5,573). É interessante notar que o mutante M26 exibiu resultados promissores na análise univariada (Capítulo I), sendo que entre os mutantes estudados foi o que apresentou a maior distância genética.

A análise de agrupamento pelo método UPGMA suporta uma expressiva parte dos resultados obtidos da análise de PCA. O agrupamento hierárquico permitiu a formação de mais grupos do que a análise PCA. Salienta-se, entretanto, que são métodos diferentes e complementares. Em estudos recentes, esses dois métodos foram aplicados em um painel diverso de arroz sul-brasileiro, em que houve um nível de concordância nos resultados entre os métodos, mas também importante complementariedade (VENSKE *et al.*, 2019; BUSANELLO *et al.*, 2020).

Estes resultados devem ser levados em consideração, como afirmação da ampliação da variabilidade genética a partir da cultivar BRS Querência, sendo uma ótima possibilidade para isolar e selecionar genes e genótipos que apresentem caracteres agrônômicos de interesse (LUZ *et al.*, 2016). Tal resultado é uma frente contra a erosão da variabilidade genética do arroz brasileiro, a qual caso não freada, prejudicará o progresso genético da cultura dentro de poucos anos (BUSANELLO *et al.*, 2020).

#### **4.4 CONCLUSÕES**

Há variabilidade genética na população de mutantes estudada quanto a tolerância ao estresse por excesso de ferro. O mutante 26 foi o que apresentou maior distância genética dos demais, podendo ser promissor para programas de melhoramento.

#### **5 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Embora os primeiros resultados deste trabalho sejam em condições artificiais de hidroponia, na observação de sintomas gerou-se grupos bem definidos em relação as testemunhas utilizadas no experimento, isto é, o genótipo tolerante (Epagri 108) e o sensível (BR IRGA 409) ao estresse por ferro. Os sintomas de algumas famílias mutantes corresponderam aos sintomas de toxidez por ferro, os quais, diminuição do comprimento de parte aérea e raiz, redução da biomassa de parte aérea e raiz, diminuição dos parâmetros fotossintéticos de clorofila a e clorofila b e aumento no bronzeamento. No entanto, algumas famílias mutantes evitaram ou minimizaram danos mais graves, elucidando mecanismos de proteção nestas famílias sob estresse por ferro. Neste trabalho, respostas diferenciais ao excesso de ferro foram identificadas nas famílias mutantes, fornecendo um primeiro passo importante na expansão do pool genético em direção ao melhoramento de linhagens / cultivares mutantes de arroz tolerantes à toxidez por Fe. As famílias mutantes que se destacaram quanto a resposta ao estresse por ferro podem ser utilizadas como fonte de variabilidade para a pesquisa genômica, e também servir como um recurso genético visando cruzamentos dirigidos.

## REFERÊNCIAS

AFZAL, Shadma *et al.* A comparative screening of abiotic stress tolerance in early flowering rice mutants. **Journal of Biotechnology**, v. 302, p. 112-122, 2019

BUSANELLO, Carlos *et al.* Is the genetic variability of elite rice in southern Brazil really disappearing?. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 20, 2020.

DEMŠAR, Janez *et al.* Orange: data mining toolbox in Python. **The Journal of Machine Learning Research**, v. 14, n. 1, p. 2349-2353, 2013.

FARIA, Priscila N. *et al.* Clustering methods in a study of genetic diversity of peppers. **Horticultura Brasileira**, v. 30, n. 3, p. 428-432, 2012.

GOVINDARAJ, Mahalingam; VETRIVENTHAN, Mani; SRINIVASAN, M. Importance of genetic diversity assessment in crop plants and its recent advances: an overview of its analytical perspectives. **Genetics Research International**, v. 2015, 2015.

KAEWCHEENCHAI, Reunreudee *et al.* Genome-Wide Association Study of Local Thai Indica Rice Seedlings Exposed to Excessive Iron. **Plants**, v. 10, n. 4, p. 798, 2021.

LAURETTO, Marcelo. Análise de Agrupamentos (Clusters). Universidade de São Paulo. <http://www.each.usp.br/lauretto/cursoR2017/04-AnaliseCluster.pdf>. Acessado em 13 de agosto de 2021

LAVINE, Barry K.; MIRJANKAR, Nikhil. Clustering and classification of analytical data. **Encyclopedia of Analytical Chemistry**, 2000, vol. 11.

LEE, Sichul *et al.* Activation of rice Yellow Stripe1-Like 16 (OsYSL16) enhances iron efficiency. **Molecules and cells**, v. 33, n. 2, p. 117-126, 2012.

LO, Shuen-Fang et al. Genetic resources offer efficient tools for rice functional genomics research. **Plant, cell & environment**, v. 39, n. 5, p. 998-1013, 2016.

LUCCA, Paola; POLETTI, Susanna; SAUTTER, Christof. Genetic engineering approaches to enrich rice with iron and vitamin A. **Physiologia Plantarum**, v. 126, n. 3, p. 291-303, 2006.

LUZ, Viviane Kopp da et al. Identification of variability for agronomically important traits in rice mutant families. **Bragantia**, v. 75, p. 41-50, 2016.

MELANDRI, Giovanni et al. Multiple small-effect alleles of Indica origin enhance high iron-associated stress tolerance in rice under field conditions in west Africa. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, 2020.

MIR, Arain Saima et al. Potential of Mutation Breeding to Sustain Food Security. In: **Genetic Variation**. IntechOpen, 2020.

MOUCHET, Maud et al. Towards a consensus for calculating dendrogram-based functional diversity indices. **Oikos**, v. 117, n. 5, p. 794-800, 2008.

Orange Visual Programming 3 documentation'. <https://orange3.readthedocs.io/projects/orange-visual-programming/en/master/widgetsunsupervised/correspondenceanalysis.html#>. Acessado em 03 de agosto de 2021

PAWAR, S., et al. Population genetic structure and association mapping for iron toxicity tolerance in rice. **PloS one**, vol. 16, no 3, p. e0246232, 2021.

ROY, Subhas Chandra; SHARMA, B. D. Assessment of genetic diversity in rice [*Oryza sativa* L.] germplasm based on agro-morphology traits and zinc-iron content for crop improvement. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 20, n. 2, p. 209-224, 2014.

STEIN, R. J. et al. Distinct physiological responses of two rice cultivars subjected to iron toxicity under field conditions. **Annals of Applied Biology**, v. 154, n. 2, p. 269-277, 2009.

STRECK, Eduardo Anibele, et al. Genetic progress in 45 years of irrigated rice breeding in Southern Brazil. **Crop Science**, 2018, vol. 58, no 3, p. 1094-1105.

SUDIANTO, Edi et al. Clearfield® rice: Its development, success, and key challenges on a global perspective. **Crop Protection**, v. 49, p. 40-51, 2013.

VENSKE, Eduardo et al. Genetic diversity, linkage disequilibrium, and population structure in a panel of Brazilian rice accessions. **Journal of Applied Genetics**, v. 60, n. 1, p. 27-31, 2019.

WIRTH, Judith *et al.* Rice endosperm iron biofortification by targeted and synergistic action of nicotianamine synthase and ferritin. **Plant Biotechnology Journal**, v. 7, n. 7, p. 631-644, 2009.

YAN, Wei et al. The Genome-Wide EMS Mutagenesis Bias Correlates With Sequence Context and Chromatin Structure in Rice. **Frontiers in Plant Science**, v. 12, p. 370, 2021.

ZAHRA, Noreen, et al. Fe toxicity in plants: Impacts and remediation. **Physiologia Plantarum**, 2021.

## **Apêndices**

**Apêndice a.** Percentual de desempenho relativo das variáveis comprimento de parte aérea (DR cpa), comprimento de raiz (DR cr), matéria seca de parte aérea (DR mspa), matéria seca de raiz (DR msr), índice de clorofila a (DR cla), índice de clorofila b (DR clb) e mancha foliar (DR mf) de 92 famílias mutantes e as testemunhas BRS Querência, BR IRGA 409 e Epagri 108. CGF/FAEM/UFPeL, 2021.

Famílias	DR cpa	DR cr	DR mspa	DR msr	DR cla	DR clb	DR mf
1	82,30 a	80,31 a	100,13 a	84,00 c	92,48 a	95,77 c	346,67 c
2	70,28 b	81,29 a	91,20 a	87,21 c	69,79 b	68,28 d	240,48 c
3	90,27 a	78,80 a	91,10 a	103,58 c	97,70 a	101,85 c	368,59 c
4	80,31 a	81,84 a	70,84 b	83,55 c	90,45 a	91,81 c	263,05 c
5	81,09 a	81,36 a	93,46 a	89,96 c	101,14 a	105,31 c	364,58 c
6	91,24 a	109,03 a	98,27 a	112,56 b	81,04 b	77,93 d	303,17 c
7	76,80 b	71,73 a	82,32 a	73,57 c	114,08 a	116,10 b	229,53 c
8	75,44 b	72,82 a	91,89 a	60,15 d	78,96 b	78,25 d	271,94 c
9	89,82 a	83,58 a	96,20 a	66,61 d	96,79 a	95,25 c	346,97 c
10	80,69 a	71,21 a	74,42 b	26,46 d	90,09 a	91,59 c	353,70 c
11	92,56 a	75,72 a	84,28 a	83,95 c	79,54 b	75,64 d	293,92 c
12	86,46 a	78,98 a	91,37 a	78,32 c	93,36 a	91,31 c	268,75 c
13	94,44 a	81,38 a	113,69 a	153,75 a	90,74 a	84,58 d	307,78 c
14	79,34 b	76,17 a	65,39 b	61,32 d	82,14 b	91,18 c	263,64 c
15	72,44 b	64,68 b	75,33 b	43,96 d	86,81 b	85,30 d	261,67 c
16	68,77 b	53,27 b	64,99 b	37,52 d	82,94 b	81,45 d	308,15 c
17	59,27 b	69,50 a	61,76 b	46,66 d	77,27 b	77,25 d	301,14 c
18	75,72 b	78,48 a	75,30 b	36,46 d	90,18 a	91,69 c	249,39 c
19	68,03 b	69,94 a	68,43 b	66,04 d	103,91 a	99,64 c	361,38 c
20	73,51 b	73,19 a	86,16 a	47,65 d	108,33 a	115,20 b	353,28 c
21	70,50 b	53,49 b	66,38 b	55,44 d	99,16 a	103,29 c	564,77 a
22	84,90 a	79,55 a	66,48 b	81,01 c	88,43 a	91,25 c	349,74 c
23	74,59 b	55,51 b	72,92 b	53,35 d	112,38 a	109,77 b	263,76 c
24	78,56 b	87,42 a	94,50 a	80,30 c	100,54 a	89,78 c	204,76 c
25	55,59 b	42,73 b	72,36 b	62,98 d	98,68 a	110,70 b	303,79 c
26	69,22 b	59,58 b	89,22 a	85,56 c	128,84 a	144,46 a	207,20 c
27	66,18 b	57,82 b	82,90 a	91,37 c	69,24 b	68,55 d	315,87 c
28	70,36 b	59,76 b	84,64 a	71,73 c	92,71 a	93,88 c	363,85 c
29	75,00 b	74,03 a	64,44 b	85,79 c	94,47 a	88,43 c	215,87 c
30	69,23 b	67,80 b	55,72 b	48,02 d	86,29 b	90,05 c	278,41 c
31	66,62 b	51,84 b	68,26 b	55,55 d	86,13 b	89,71 c	268,43 c
32	72,49 b	57,66 b	81,74 a	71,34 c	81,03 b	86,85 d	388,11 b
33	73,84 b	87,11 a	66,68 b	53,36 d	81,76 b	83,04 d	204,76 c
34	72,49 b	70,57 a	65,01 b	66,87 d	90,28 a	91,38 c	460,56 b
35	64,29 b	83,82 a	71,18 b	49,61 d	81,44 b	82,16 d	215,08 c
36	63,60 b	73,20 a	78,44 a	54,39 d	98,16 a	98,04 c	212,73 c
37	76,62 b	37,16 b	73,06 b	65,89 d	78,61 b	79,26 d	298,08 c
38	62,59 b	47,62 b	72,27 b	78,06 c	90,80 a	97,48 c	323,31 c
39	70,48 b	71,11 a	80,14 a	56,36 d	90,41 a	92,25 c	308,33 c
40	68,35 b	61,75 b	67,61 b	81,83 c	41,16 b	52,70 d	518,39 a
41	75,44 b	66,97 b	63,55 b	51,16 d	97,67 a	96,09 c	273,86 c

42	71,08	b	60,04	b	96,17	a	78,22	c	72,66	b	71,38	d	220,20	c
43	67,77	b	69,57	a	79,67	a	63,51	d	100,99	a	98,11	c	250,00	c
44	64,23	b	63,70	b	55,48	b	48,85	d	84,60	b	86,80	d	641,67	a
45	98,82	a	67,91	b	55,68	b	54,69	d	75,94	b	74,29	d	431,35	b
46	86,27	a	67,00	b	57,82	b	47,95	d	83,40	b	83,97	d	414,58	b
47	84,12	a	57,86	b	60,02	b	51,12	d	85,03	b	84,29	d	486,51	a
48	85,96	a	53,31	b	82,93	a	48,53	d	79,05	b	78,01	d	345,69	c
49	85,76	a	80,70	a	92,84	a	56,28	d	79,27	b	78,79	d	286,26	c
50	92,98	a	90,97	a	87,90	a	92,62	c	88,03	a	78,75	d	551,28	a
51	88,39	a	90,83	a	85,58	a	80,04	c	88,62	a	90,42	c	258,70	c
52	51,92	b	70,04	a	89,26	a	28,85	d	80,57	b	83,23	d	460,61	b
53	76,95	b	58,55	b	79,53	a	100,97	c	80,66	b	85,77	d	366,67	c
54	126,04	a	91,33	a	58,57	b	51,23	d	66,69	b	71,02	d	474,81	b
55	92,43	a	63,35	b	65,52	b	54,21	d	86,30	b	87,08	d	410,23	b
56	64,40	b	42,86	b	80,60	a	40,02	d	74,59	b	74,92	d	389,39	b
57	83,02	a	73,13	a	53,91	b	78,20	c	83,58	b	82,25	d	555,19	a
58	85,37	a	77,11	a	46,48	b	51,50	d	70,56	b	71,75	d	518,43	a
59	105,53	a	77,09	a	78,38	a	86,65	c	90,65	a	97,50	c	411,11	b
60	91,97	a	59,54	b	55,84	b	57,80	d	67,74	b	63,48	d	349,62	c
61	101,46	a	95,78	a	79,20	a	55,14	d	71,89	b	73,16	d	396,97	b
62	87,58	a	54,83	b	67,46	b	71,07	c	84,21	b	85,29	d	422,30	b
63	78,38	b	46,36	b	81,68	a	52,46	d	97,14	a	98,67	c	327,59	c
64	63,37	b	67,23	b	69,12	b	45,37	d	94,33	a	93,88	c	322,91	c
65	71,07	b	52,81	b	66,10	b	55,43	d	86,06	b	88,04	d	381,01	b
66	75,67	b	64,68	b	83,16	a	61,60	d	100,76	a	106,83	b	223,65	c
67	93,49	a	55,10	b	76,28	a	42,73	d	98,72	a	91,27	c	419,58	b
68	80,30	a	66,38	b	67,88	b	70,70	c	93,44	a	95,34	c	373,98	c
69	83,06	a	58,79	b	86,76	a	61,76	d	74,52	b	79,88	d	569,84	a
70	92,16	a	72,75	a	58,87	b	63,86	d	81,83	b	78,85	d	385,29	b
71	77,36	b	63,86	b	69,33	b	44,41	d	90,65	a	92,25	c	280,42	c
72	68,27	b	51,07	b	59,40	b	44,43	d	83,98	b	87,24	d	371,14	c
73	75,24	b	62,65	b	85,07	a	70,44	c	76,63	b	75,67	d	387,88	b
74	88,81	a	56,87	b	83,50	a	76,41	c	86,39	b	82,76	d	461,64	b
75	74,73	b	77,48	a	62,75	b	47,31	d	98,14	a	100,14	c	380,16	b
76	71,86	b	57,79	b	80,17	a	84,20	c	84,75	b	85,44	d	363,64	c
77	81,68	a	68,92	a	81,28	a	87,95	c	82,91	b	78,24	d	344,85	c
78	83,62	a	66,46	b	46,00	b	60,06	d	78,12	b	71,31	d	527,78	a
79	89,73	a	74,89	a	75,80	b	79,22	c	89,64	a	90,45	c	394,71	b
80	95,57	a	77,92	a	99,51	a	58,32	d	86,83	b	86,95	d	341,26	c
81	94,65	a	90,41	a	98,42	a	88,45	c	93,13	a	92,17	c	280,56	c
82	85,62	a	64,08	b	75,59	b	51,49	d	80,67	b	78,40	d	392,12	b
83	95,17	a	75,28	a	81,38	a	59,15	d	79,08	b	75,03	d	318,33	c
84	71,99	b	70,90	a	83,27	a	39,65	d	98,70	a	100,37	c	264,31	c
85	86,37	a	73,85	a	85,26	a	63,86	d	83,49	b	92,38	c	470,37	b
86	82,42	a	56,99	b	77,58	a	29,41	d	88,68	a	83,47	d	468,75	b
87	77,48	b	63,64	b	77,41	a	48,25	d	80,76	b	81,98	d	361,11	c
88	93,69	a	81,46	a	87,49	a	59,69	d	80,84	b	79,63	d	277,78	c
89	84,27	a	69,31	a	88,24	a	66,56	d	80,98	b	76,92	d	383,80	b

90	84,64 a	65,76 b	64,89 b	33,94 d	79,78 b	80,45 d	355,26 c
91	92,06 a	76,34 a	98,63 a	67,92 d	104,45 a	104,20 c	365,14 c
92	86,66 a	83,47 a	71,22 b	41,34 d	88,10 a	88,75 c	399,21 b
<b>93</b>	82,17 a	71,03 a	84,22 a	80,77 c	94,09 a	91,76 c	380,78 b
<b>94</b>	73,85 b	59,20 b	73,36 b	58,94 d	83,66 b	82,46 d	521,71 a
<b>95</b>	67,67 b	69,51 a	64,89 b	67,01 d	90,20 a	93,83 c	386,15 b

\*Médias seguidas da mesma letra, na coluna, pertencem ao mesmo grupo, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro. Testemunhas: **93**: Epagri 108; **94**: BR IRGA 409; **95**: BRS Querência.

**Apêndice b.** Pesos dos componentes principais, e contribuições das variáveis individuais de desempenho relativo de comprimento de parte aérea (DR cpa), comprimento de raiz (DR cr), matéria seca de parte aérea (DR mspa), matéria seca de raiz (DR msr), índice de clorofila a (DR cla), índice de clorofila b (DR clb) e mancha foliar (DR mf) de 92 famílias mutantes e as testemunhas BRS Querência, BR IRGA 409 e Epagri 108. CGF/FAEM/UFPel, 2021.

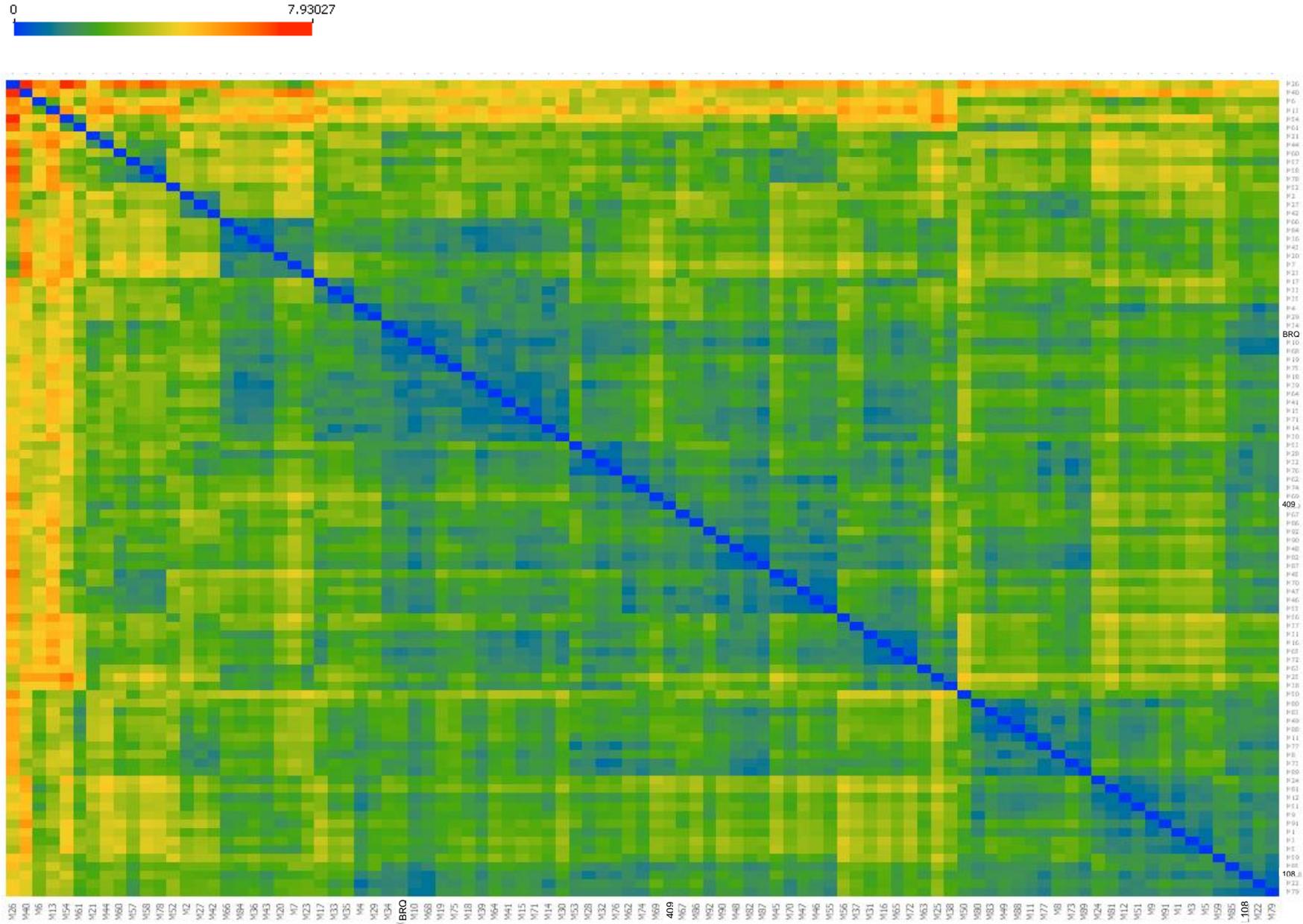
Genotipo	PC1	PC2	PC3	cpa	cr	mspa	msr	cla	clb	mancha
M26	5.855	-1.668	-0.912	-0.895	-0.754	0.968	1.076	3.628	4.528	-1.569
M7	3.456	-0.549	-0.612	-0.243	0.215	0.443	0.460	2.342	2.261	-1.332
M20	2.489	-1.070	-1.126	-0.526	0.331	0.735	-0.868	1.842	2.190	-0.017
M23	2.364	-1.962	-0.639	-0.433	-1.078	-0.272	-0.576	2.194	1.756	-0.968
M5	2.260	1.141	-0.586	0.125	0.982	1.291	1.301	1.215	1.399	0.102
M66	2.244	-0.772	0.172	-0.340	-0.347	0.507	-0.153	1.182	1.521	-1.394
M24	2.209	1.437	0.717	-0.091	1.465	1.370	0.806	1.163	0.159	-1.595
M91	2.131	0.990	-1.165	1.069	0.582	1.684	0.170	1.504	1.311	0.108
M13	2.112	4.433	1.130	1.274	0.984	2.831	4.573	0.309	-0.258	-0.501
M3	1.875	1.809	-0.713	0.915	0.778	1.111	1.999	0.915	1.123	0.144
M43	1.801	-0.809	0.472	-1.020	0.0421	0.241	-0.055	1.202	0.824	-1.114
M36	1.758	-1.035	0.791	-1.378	0.331	0.148	-0.523	0.955	0.819	-1.510
M25	1.720	-2.923	0.697	-2.067	-2.097	-0.315	-0.082	1.001	1.831	-0.543
M81	1.675	2.624	-0.153	1.292	1.7035	1.668	1.224	0.518	0.350	-0.790
M1	1.568	1.525	0.124	0.229	0.898	1.799	0.996	0.461	0.638	-0.088
M84	1.546	-1.051	0.050	-0.657	0.148	0.515	-1.279	1.003	1.005	-0.963
M9	1.425	1.395	-0.658	0.876	1.159	1.501	0.104	0.836	0.596	-0.084
M12	1.389	1.347	0.218	0.587	0.792	1.132	0.704	0.538	0.281	-0.915
M19	1.272	-1.159	-0.563	-0.997	0.071	-0.614	0.075	1.456	0.947	0.068
M51	1.095	1.902	0.043	0.753	1.737	0.691	0.792	0.125	0.210	-1.022
M29	0.963	0.081	0.568	-0.398	0.398	-0.9181	1.087	0.634	0.051	-1.477
M63	0.941	-1.516	-0.026	-0.1078	-1.808	0.394	-0.622	0.867	0.869	-0.291
M4	0.876	0.763	0.104	0.0583	1.020	-0.430	0.972	0.284	0.321	-0.976
M28	0.825	-0.590	0.450	-0.797	-0.739	0.619	0.366	0.481	0.486	0.094
108	0.784	0.620	-0.278	0.218	0.158	0.588	0.830	0.601	0.317	0.274
M41	0.778	-1.275	-0.327	-0.360	-0.164	-0.985	-0.688	0.913	0.663	-0.861
M38	0.770	-1.679	0.943	-1.465	-1.707	-0.322	0.690	0.315	0.774	-0.336

M6	0.769	4.302	0.578	0.998	3.188	1.657	2.460	-0.535	-0.787	-0.550
M39	0.684	-0.522	0.436	-0.7879	0.165	0.276	-0.421	0.280	0.356	-0.495
M75	0.572	-1.091	-1.247	-0.421	0.672	-1.046	-0.886	0.954	0.986	0.267
M18	0.567	-0.574	0.124	-0.336	0.752	-0.091	-1.443	0.260	0.312	-1.121
M64	0.522	-1.683	0.196	-1.399	-0.143	-0.561	-0.985	0.622	0.487	-0.340
M80	0.471	1.618	-0.250	1.371	0.708	1.752	-0.321	-0.030	-0.066	-0.145
M59	0.455	1.797	-1.757	2.227	0.642	0.142	1.131	0.301	0.7751	0.596
M68	0.375	-0.438	-0.658	0.057	-0.211	-0.656	0.3137	0.544	0.603	0.201
M71	0.265	-1.134	0.005	-0.195	-0.412	-0.545	-1.034	0.302	0.356	-0.791
M10	0.209	-0.192	-0.384	0.090	0.173	-0.158	-0.321	0.253	0.304	-0.013
M22	0.174	0.693	-0.610	0.453	0.837	-0.763	0.842	0.108	0.276	-0.055
M79	0.154	0.918	-0.812	0.868	0.466	-0.053	0.750	0.213	0.212	0.422
BRQ	0.1308	-0.952	-0.1622	-1.029	0.037	-0.883	0.124	0.262	0.482	0.331
M31	0.0692	-1.75	1.0513	-1.119	-1.370	-0.627	-0.463	-0.091	0.153	-0.919
M15	0.0538	-0.949	0.783	-0.618	-0.347	-0.088	-1.057	-0.033	-0.198	-0.991
M35	0.030	-0.316	1.319	-1.319	1.178	-0.405	-0.767	-0.500	-0.449	-1.485
M76	0.0229	-0.151	0.906	-0.668	-0.896	0.279	1.005	-0.211	-0.187	0.092
M21	0.012	-2.120	-1.660	-0.785	-1.239	-0.770	-0.468	1.04286	1.238	2.228
M14	0.012	-0.072	0.172	-0.024	0.568	-0.845	-0.167	-0.439	0.271	-0.970
M33	-0.023	0.177	0.775	-0.497	1.440	-0.747	-0.575	-0.4727	-0.379	-1.595
M67	-0.027	-0.794	-1.450	1.192	-1.110	-0.0168	-1.121	1.004	0.278	0.686
M8	-0.048	0.660	1.464	-0.360	0.301	1.171	-0.227	-0.716	-0.761	-0.881
M53	-0.0718	0.545	0.906	-0.230	-0.836	0.230	1.866	-0.567	-0.161	0.124
M49	-0.122	1.358	0.746	0.527	0.929	1.2442	-0.425	-0.689	-0.719	-0.729
M88	-0.154	1.620	0.244	1.209	0.989	0.836	-0.250	-0.552	-0.652	-0.819
M42	-0.218	0.737	2.829	-0.735	-0.716	1.497	0.699	-1.265	-1.310	-1.431
M77	-0.253	1.041	0.704	0.176	-0.009	0.363	1.198	-0.372	-0.762	-0.107
M30	-0.258	-1.521	0.221	-0.894	-0.098	-1.581	-0.849	-0.077	0.180	-0.813
M85	-0.2638	0.674	-0.836	0.579	0.383	0.667	-0.037	-0.321	0.367	1.225
M32	-0.302	-0.369	0.738	-0.614	-0.906	0.398	0.346	-0.535	-0.074	0.352
M34	-0.327	-0.675	-0.754	-0.614	0.122	-0.874	0.117	0.269	0.286	1.121
M11	-0.3401	1.911	0.598	1.112	0.532	0.592	0.993	-0.666	-0.970	-0.648
M92	-0.429	0.155	-1.210	0.604	1.150	-0.401	-1.192	0.080	0.077	0.469
M2	-0.4391	1.775	2.547	-0.804	0.976	1.119	1.160	-1.514	-1.558	-1.216
M50	-0.542	2.624	-1.301	1.148	1.748	0.868	1.437	0.0740	-0.721	2.085
M65	-0.579	-1.582	0.190	-0.736	-1.293	-0.791	-0.469	-0.097	0.0198	0.276
M74	-0.600	0.449	-0.377	0.789	-0.969	0.532	0.606	-0.069	-0.4013	1.133
M89	-0.629	0.902	0.427	0.399	0.022	0.893	0.101	-0.540	-0.867	0.306
M52	-0.712	-1.485	0.974	-2.383	0.080	0.971	-1.832	-0.576	-0.364	1.122
M87	-0.778	-0.480	0.383	-0.184	-0.430	0.069	-0.837	-0.559	-0.464	0.065
M83	-0.858	1.333	0.0731	1.336	0.497	0.371	-0.278	-0.705	-1.019	-0.389
M55	-0.892	-0.248	-1.130	1.10146	-0.453	-0.836	-0.532	-0.077	-0.056	0.586
M37	-0.894	-1.239	1.406	-0.258	-2.540	-0.261	0.066	-0.746	-0.681	-0.604
M16	-0.915	-1.931	0.783	-0.933	-1.256	-0.876	-1.388	-0.369	-0.506	-0.497
M62	-0.924	-0.293	-0.515	0.684	-1.132	-0.688	0.332	-0.258	-0.199	0.715
M73	-0.931	0.320	1.056	-0.378	-0.508	0.652	0.300	-0.918	-0.968	0.349
M72	-0.960	-2.189	0.220	-0.977	-1.432	-1.302	-1.034	-0.279	-0.043	0.171

M48	-1.001	-0.275	0.551	0.544	-1.253	0.490	-0.823	-0.7081	-0.780	-0.098
M86	-1.062	-1.184	-0.809	0.239	-0.960	0.082	-1.804	0.1307	-0.344	1.208
M27	-1.110	0.438	2.530	-1.156	-0.893	0.487	1.373	-1.562	-1.536	-0.415
M17	-1.117	-1.355	1.300	-1.751	0.036	-1.122	-0.919	-0.863	-0.842	-0.571
M82	-1.169	-0.023	-0.084	0.515	-0.394	-0.068	-0.671	-0.567	-0.749	0.394
409	-1.284	-0.788	-0.389	-0.497	-0.784	-0.238	-0.289	-0.306	-0.425	1.771
M46	-1.375	-0.635	-1.003	0.570	-0.162	-1.422	-0.853	-0.329	-0.304	0.633
M70	-1.380	0.410	-0.833	1.077	0.296	-1.341	-0.037	-0.465	-0.713	0.322
M90	-1.414	-0.747	-0.318	0.430	-0.261	-0.884	-1.571	-0.645	-0.586	0.003
M47	-1.544	-1.028	-1.139	0.385	-0.890	-1.254	-0.690	-0.1871	-0.279	1.397
M56	-1.565	-1.811	1.550	-1.310	-2.086	0.311	-1.259	-1.096	-1.028	0.365
M61	-1.626	2.442	-0.8007	1.877	2.131	0.205	-0.484	-1.331	-1.169	0.446
M57	-1.742	0.089	-1.515	0.2912	0.326	-1.719	0.698	-0.3132	-0.442	2.126
M69	-1.769	0.235	-0.355	0.294	-0.817	0.781	-0.145	-1.102	-0.631	2.282
M44	-1.997	-1.916	-1.386	-1.324	-0.425	-1.600	-0.807	-0.225	-0.0781	3.045
M45	-2.366	0.3451	-1.173	1.650	-0.0897	-1.585	-0.507	-0.979	-1.078	0.811
M78	-2.858	-0.536	-1.173	0.3427	-0.205	-2.321	-0.232	-0.789	-1.316	1.835
M60	-2.886	0.131	0.328	1.061	-0.756	-1.573	-0.348	-1.693	-1.941	-0.056
M58	-3.182	-0.085	-1.212	0.4931	0.643	-2.285	-0.671	-1.448	-1.281	1.736
M54	-3.201	2.718	-2.621	3.992	1.777	-1.364	-0.684	-1.784	-1.339	1.273
M40	-4.589	0.707	2.085	-0.970	-0.582	-0.676	0.884	-4.008	-2.803	1.735

---

**Apêndice c.** Matriz de calor obtido através da análise 92 famílias mutantes M8 e as cultivares BRS Querência, BR IRGA 409 e Epagri 108 pela distância Euclidiana.CGF/FAEM/UFPeI, 2021.



**Apêndice d.** Diferenças na parte aérea das cultivares (a) BRS Querência - controle, (b) BRS Querência - estresse, (c) Epagri 108 – controle, (d) Epagri 108 - estresse e (e) BR IRGA 409 – controle, (f) BR IRGA 409 - estresse, na condição de estresse por ferro por 14 dias a  $400 \text{ mg L}^{-1} \text{ Fe}^{2+}$  ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), apresentando um desenvolvimento de 28 dias após germinação.

