

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



**Tese**

**Aspectos químicos e moleculares do acúmulo de minerais em grãos de arroz**

**Victoria Freitas de Oliveira**

**Pelotas, 2023**

**Victoria Freitas de Oliveira**

**Aspectos químicos e moleculares do acúmulo de minerais em  
grãos de arroz**

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

Orientadora: Camila Pegoraro, Dr.

Co-orientador: Eduardo Venske, Dr.

Martin Karter, Dr.

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas  
Catalogação na Publicação

O48a Oliveira, Victoria Freitas de

Aspectos químicos e moleculares do acúmulo de minerais em grãos de arroz / Victoria Freitas de Oliveira ; Camila Pegoraro, orientadora ; Eduardo Venske, Martin Kater, coorientadores. – Pelotas, 2023.

188 f.

Tese (Doutorado) – Agronomia, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2023.

1. Mapeamento genético. 2. *Oryza sativa* L.. 3. Metais pesados. 4. Elementos traços. 5. Edição de genomas. I. Pegoraro, Camila, orient. II. Venske, Eduardo, coorient. III. Kater, Martin, coorient. IV. Título.

CDD : 633.183

Elaborada por Ubirajara Buddin Cruz CRB: 10/901

**Banca Examinadora:**

Dra. Camila Pegoraro, FAEM/UFPEL (Presidente)

Dr. Daniel da Rosa Farias, IFC

Dr. Gustavo Heiden, Embrapa

Dra. Viviane Kopp da Luz, FAEM/UFPEL

“Dedico a toda a minha família, aos meus amigos e todas as pessoas especiais que ajudaram de alguma forma para a realização dessa etapa”.

## **Agradecimentos**

Primeiramente a mim por nunca desistir desse objetivo, por ter fé para superar todos os obstáculos encontrados, força em todos os momentos, especialmente nos difíceis, e saúde física e mental, e paz para que eu pudesse seguir o meu caminho com dignidade.

Aos meus pais Antonio Costa de Oliveira e Carla Sampaio Freitas de Oliveira por todo o amor, carinho, apoio e pelo incentivo para que eu jamais desistisse dos meus objetivos e dos meus sonhos, meu eterno obrigado.

Ao meu irmão Eduardo Freitas de Oliveira, por ser um pilar muito importante na minha vida, o melhor companheiro de caminhada de decisões e alegrias, por compartilhar todas as angústias e dificuldade e me acolher tão bem, por ser meu maior incentivador, auxiliar a cada passo do meu futuro e vibrando em cada vitória.

Aos meus familiares, por todo o apoio, por me acompanharem, vibrando e comemorando comigo todas as conquistas, por esbanjarem muito carinho ao longo da minha vida, especialmente meus primos que nunca mediram esforços para estender a mão: Caetano Oliveira, Isabella Nolte, Joana Oliveira e Pedro Schanzer.

Aos meus amigos do laboratório Amanda Basseggio, Cíntia Garcia, Jennifer Lopes, Jennifer Villavicencio, Karine Janner, Latóia Maltzhan, Tiago Corazza, Rebeca Fernandes, Raíssa Martins e Viviane Luz, pela amizade, pelo carinho, pela ajuda no experimento, pela motivação e por compartilharem todas as alegrias e angústias, especialmente a Valéria Nizolli que nos últimos oito meses tem sido a peça chave para o final do doutorado. Meu muito obrigada por tornarem a vida mais alegre diariamente.

Aos meus amigos da graduação Alisson Pagnussatt, Eduardo Valmorbida, Francisco Seger, João Vicente Bazzan, Maíra Moura, e pela amiga desde a época do colégio Juliana Rosinha, pelo incentivo, palavras que confortam e pelos encontros menos frequentes mas cheios de amor e saudade, permanecendo a mesma amizade de anos. Aos amigos Alice Pereira, Jean Louzada (*in memoriam*), Luciana Schoeder, Silvana Rosa, pelo auxílio no experimento, pelo companheirismo, amizade, pelo apoio, por

comemorarem comigo as vitórias e por todos os momentos alegres que passamos juntos que vão ficar no meu coração.

Aos meus amigos e estagiários Allisson Ramires, Diogo Winter, Gabriel Brayer, Larissa Bassini e Vinicius Flores, pelo auxílio de experimento, momentos alegres, pelo apoio e companherismo, tornando os dias mais leves no CGF.

Aos meus amigos de Milão na Itália, Alexandre Bellas, Beatriz Finder, Luisa Fecchio, Milena Vercillo, Thaiane Elise Valverde e Vicente Zeron por me acolherem como família e por serem minha família milanese, sem vocês a aventura não seria tão perfeita.

Aos demais amigos, Alexandre Santuchi, Arthur Faria, Carol Iplinsky, Cássio Mura, Felipe Pascutti, Gabriella Ianelli, Juliana Maines, Julia Rangel, Lukrecija Zigmantaitè, Mariane Rocha e Pedro Gianjoppe, obrigada pela parceria e pelo companherismo nessa jornada de intercâmbio e me proporcionarem momentos felizes nesses seis meses.

Ao meu namorado Andrei Vasconcelos, por ter me aceitado a dividir a vida, por tornar meus dias mais leves, me auxiliar nos momentos de angústias e frustrações, pelo apoio incondicional e por ser uma motivação, me iluminando diariamente.

Aos meus sogros, Wagner Vitória e Zélia Seibt, por me acolherem, me aconselharem e por me proporcionarem momentos bons e cheio de carinho e conhecimento.

A minha orientadora Prof. Dra. Camila Pegoraro, por ter me aceitado a me orientar todos esses anos, por estar sempre presente e disposta, pelo apoio, por confiar em mim, pela amizade, pela ajuda nos experimentos e sempre me dar um norte contribuindo para o meu crescimento pessoal e profissional.

Ao meus co-orientadores Eduardo Venske e Martin Kater, pela disposição pela ajuda no experimento, pelo incentivo, pelos conhecimentos transmitidos e amizade.

A minha psicóloga Milene Tavares, por me auxiliar no meu crescimento pessoal e profissional desde o meio do doutorado até o fim, por me acalmar em momentos frustrantes, tristes e angustiantes. Agradeço todo o trabalho de auto conhecimento desenvolvido até aqui, me tornando uma

pessoa melhor cada dia.

Aos meus colegas e amigos do laboratório da Università Degli Studi di Milano (UNIMI), Gregorio Orosco, pelo auxílio no experimento, pela amizade, pelos ensinamentos disseminados, Antonietta Saccomanno, Sarah Belcapo e Chiara Paleni, pelo incrível acolhimento, pelo companherismo, ótima rotina de laboratório e por todos os ensinamentos adquiridos.

Aos meus colegas do Centro de Genômica e Fitomelhoramento (CGF) e aos professores, por esses dez anos de convivência, por terem me proporcionado tanto conhecimento e contribuindo no meu crescimento pessoal e profissional.

Ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia/FAEM-UFPel pela oportunidade do curso de doutorado, ao CNPq pelo financiamento da bolsa, a CAPES pelo financiamento da bolsa de doutorado sanduíche.

A Embrapa pelo fornecimento das sementes e pela ajuda na execução dos experimentos situados no campo experimental na estação de terras baixas.

Finalmente à Universidade Federal de Pelotas (UFPel) que ofertou uma imensa parte do conhecimento para a minha formação como engenheira agrônoma, mestre e curso de doutorado, me preparando para alcançar a realização profissional.

Obrigada.

*“ Foi só então que eu entendi que os fios da vida nem sempre são tecidos como queremos; às vezes, o padrão ao final é diferente do que imaginamos que seria, e, naquele momento, eu não tinha mais nada a fazer senão estar em paz com o que ficaria no passado” (Amita Trasi)*

## Resumo

OLIVEIRA, Victoria Freitas de. **Aspectos químicos e moleculares do acúmulo de minerais em grãos de arroz**. 2023. 188f. (Doutorado em agronomia – área de concentração: Fitomelhoramento) - Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, 2023.

O arroz é amplamente cultivado e é considerado um dos cereais mais importantes economicamente. Apesar de ser alimento básico para mais da metade da população mundial, o arroz é carente em elementos essenciais, e por outro lado, pode acumular elementos tóxicos quando cultivado em áreas contaminadas. A deficiência nutricional pode ocorrer por diferentes minerais, dentre eles o ferro (Fe), que causa sérias perturbações como anemia e doenças degenerativas. Uma das estratégias mais viáveis e econômicas para superar a deficiência por Fe é biofortificação genética, que também pode ser utilizada para reduzir o acúmulo de elementos tóxicos nos grãos de arroz. A caracterização da variabilidade genética permite identificar os genótipos que apresentam maior teor de elementos essenciais e com menor concentração de metais pesados, os quais podem ser inseridos em blocos de cruzamento visando o desenvolvimento de cultivares biofortificadas. O mapeamento associativo é uma ferramenta para identificar sequências que controlam características de interesse, contribuindo para superar obstáculos do melhoramento convencional, e evidenciando genes que poderão ser manipulados via transgenia e edição gênica. Essas ferramentas podem ser empregadas no desenvolvimento de cultivares biofortificadas. Desta forma, o objetivo do estudo foi a caracterização de genótipos de arroz quanto ao acúmulo de minerais e elementos tóxicos no grão de arroz; mapeamento associativo para acúmulo de Fe em grãos de arroz; e a construção de um plasmídeo de edição de um gene que participa no metabolismo do Fe. Para o primeiro e segundo estudos um total de 88 acessos de arroz foram genotipados com 7098 marcadores SNPs e fenotipados quanto a concentração de elementos essenciais cobre(Cu), ferro, manganês (Mn), selênio (Se) e zinco (Zn) e elementos tóxicos arsênio (As), cádmio (Cd) e chumbo (Pb), em duas safras. Foi possível observar que os genótipos BRS Fronteira, Epagri 108, IRGA 424 CL e Selênio se caracterizam por apresentar menor acúmulo de As nos grãos. Os genótipos Epagri 107, Epagri 109 e Irat 162 mostraram maior acúmulo de Zn nos grãos. Os maiores teores de Fe foram encontrados nos genótipos BRS A701 CL, Carnaroli, Puitá Inta CL e SCS 112. Esses genótipos podem ser utilizados em blocos de cruzamento visando o desenvolvimento de cultivares biofortificadas. Foram mapeados 13 genes candidatos associados ao acúmulo de Fe em grãos de arroz integral, os quais estão localizados nos cromossomos 1, 5, 6 e 10. No terceiro estudo foi possível construir um plasmídeo para edição de gene envolvido no metabolismo do Fe. A continuidade dessa pesquisa em longo prazo poderá trazer resultados mais concretos para biofortificação de Fe arroz.

**Palavras-Chave:** mapeamento genético, *Oryza sativa* L., metais pesados, elementos traços, edição de genomas.

## Abstract

OLIVEIRA, Victoria Freitas de. **Chemical and molecular aspects of mineral accumulation in rice grains**. 2023. 188f. Thesis (Doctorate's degree in Agronomy – concentration area: Plant Breeding) – Graduate Program in Agronomy, Department of Crop Science, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, 2023.

The rice crop, considered one of the most economically important cereals, widely cultivated. Despite being a staple food for more than half of the world's population, rice is lacking in essential elements and, on the other hand, can accumulate toxic elements when grown in contaminated areas. Nutritional deficiency may occur due to different minerals, including iron (Fe), which causes serious disorders such as anemia and degenerative diseases. One of the most viable and economical strategies to overcome Fe deficiency is genetic biofortification, which can also be used to reduce the accumulation of toxic elements in rice grains. The characterization of genetic variability makes it possible to identify genotypes that have a higher content of essential elements and a lower concentration of heavy metals, which can be inserted in crossing blocks aiming at the development of biofortified cultivars. Associative mapping is a tool to identify sequences that control traits of interest, helping to overcome obstacles in conventional breeding, and highlighting genes that can be manipulated via transgenics and gene editing. These tools can be used in the development of biofortified cultivars. Thus, the objective of the study was the characterization of rice genotypes regarding the accumulation of minerals and toxic elements in the rice grain; associative mapping for Fe accumulation in rice grains; and the construction of a gene editing plasmid that participates in Fe metabolism. For the first and second studies, a total of 88 accessions of rice were genotyped with 7098 SNPs markers and phenotyped for the concentration of essential elements copper (Cu), iron, manganese (Mn), selenium (Se) and zinc (Zn) and toxic elements arsenic (As), cadmium (Cd) and lead (Pb), in two harvest seasons. It was possible to observe that the genotypes BRS Fronteira, Epagri 108, IRGA 424 CL and Selênio are characterized by presenting less accumulation of As in the grains. The genotypes Epagri 107, Epagri 109 and Irat 162 showed greater accumulation of Zn in the grains. The highest Fe contents were found in the genotypes BRS A701 CL, Carnaroli, Puitá Inta CL and SCS 112. These genotypes can be used in crossing blocks aiming at the development of biofortified cultivars. Thirteen candidate genes associated with Fe accumulation in brown rice grains, which are located on chromosomes 1, 5, 6 and 10, were mapped. In the third study, it was possible to construct a plasmid for editing a gene involved in Fe metabolism. The continuity of this research in the long term may bring more concrete results for the biofortification of Fe in rice.

**Key-Words:** genetic mapping, *Oryza sativa* L., heavy metals, trace elements, genome editing.

## Lista de figuras

- Figura 1.** Captação de Fe pelas plantas. A: Estratégia I ou estratégia baseada em redução na captação de ferro. B: Estratégia II ou estratégia baseada em quelatação na captação de ferro. .... 34
- Figura 2.** Estratégia combinada I e II usados em algumas gramíneas. .... 37
- Figura 3.** Diferentes estratégias de transgenia para a biofortificação no arroz. 59
- Figura 4.** Perfil das condições climáticas das duas safras (2016/2017 e 2018/2019), onde os genótipos de arroz foram cultivados, na Estação Experimental Terras Baixas da Embrapa, perto da cidade de Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil. .... 78
- Figura 5.** Acúmulo médio de cádmio (Cd) ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) em grãos de arroz integral e polido de diferentes genótipos. Médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ( $p \leq 0,05$ ). A linha pontilhada representa o limite máximo de Cd permitido em arroz no Brasil (ANVISA, 2013). .... 98
- Figura 6.** Acúmulo médio de chumbo (Pb) ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) em grãos de arroz integral e polido de diferentes genótipos. Médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ( $p \leq 0,05$ ). A linha pontilhada representa o limite máximo de Pb permitido em arroz no Brasil (ANVISA, 2013). .... 99
- Figura 7.** Acúmulo de arsênio (As) ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) em grãos de arroz integral e polido de diferentes genótipos. Médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ( $p \leq 0,05$ ). A linha pontilhada representa o limite máximo de As permitido em arroz no Brasil (ANVISA, 2013). .... 100
- Figura 8.** Heatmap demonstrando a distância Euclidiana e o agrupamento hierárquico usando métodos de grupos pares não ponderados com média aritmética (UPGMA) nos genótipos de arroz considerando o acúmulo de Fe, Mn, Cu, Zn, Se, As, Cd e Pb em grãos. O ponto de corte (3,25/55%) foi determinado através da média + K (1,25) x DP. .... 102
- Figura 9.** Gráfico de Quantile-quantile (QQ) de marcadores SNP e gráfico de Manhattan plot do  $-\text{Log}_{10}(P)$  vs, posição do cromossômica de marcadores SNP associado ao teor de Fe em arroz integral em um painel diverso cultivado no sul do Brasil. .... 112
- Figura 10.** Representação esquemática do plasmídeo que será utilizado para edição do gene *OsIRO3*. FLAG: FLAG® alvo epitope, seguido por um local de clivagem de enteroquinase. M13 fwd: iniciador de sequenciamento comum, uma das múltiplas variantes semelhantes. RB T-DNA repeat: *right border* - repetição de borda direita de nopalina C58 T-DNA. pVS1 StaA: proteína de estabilidade do plasmídeo *Pseudomonas* pVS1 (HEEB et al., 2000). pVS1 RepA: proteína de replicação do plasmídeo *Pseudomonas* pVS1 (HEEB et al., 2000). pVS1 oriIV: origem de replicação para o plasmídeo *Pseudomonas* pVS1 (HEEB et al., 2000). Bom: base da região de mobilidade de pBR322. Ori: número de cópias alto ColE1/pMB1/pBR322/pUC origem de replicação. KanR: sequência do gene cuja proteína confere resistência ao antibiótico canamicina (na bactéria). NOS terminator: terminador de nopalina sintase e sinal poli(A). LB T-DNA repeat: left

border – repetição de borda esquerda de nopalina C58 T-DNA. CAMV poly(A) signal: sinal de poliadenilação do *Cauliflower mosaic virus* (CaMV). HygR: sequência do gene no qual proteína confirma a resistência ao antibiótico higromicina (na planta). CaMV 35S promoter (enhanced): promotor do *Cauliflower mosaic virus* (CaMV), com uma região intensificadora duplicada - promotor usado para o gene Hygro. CAP binding site: A ligação CAP ativa a transcrição na presença de cAMP. lac promoter: promotor para *E. coli* lac operon. lac operator: O repressor lac se liga ao operador lac para inibir a transcrição em *E. coli*. Esta inibição pode ser aliviada pela adição de lactose ou isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosídeo (IPTG). M13 rev: iniciador de sequenciamento comum, uma das múltiplas variantes semelhantes. gRNA scaffold: RNA guia para o sistema CRISPR/Cas9 de *Streptococcus pyogenes*. OsU3 promoter: *Oryza sativa* L. (arroz) promotor do snRNA U3. Ubi promoter: promotor do gene de poliubiquitina de arroz (*Oryza sativa* L.) RUBQ2. attB1: local de recombinação para a reação Gateway® BP. 3xFLAG: três alvos de epítipo FLAG® em tandem, seguidas por um local de clivagem de enteroquinase. SV40 NILS: sinal de localização nuclear do antígeno T grande SV40 (vírus símio 40). Cas9: Cas9 (Csn1) endonuclease do sistema CRISPR/Cas de *Streptococcus pyogenes* Tipo II. Nucleoplasmin NILS: sinal de localização nuclear bipartido da nucleoplasmina. attB2: versão mutante de *attB*. ..... 123

**Figura 11.** Gel de agarose demonstrando que a banda 17 apresenta o plasmídeo com fragmento de interesse e as outras não amplificaram. .... 130

**Figura 12.** Sequenciamento das colônias de *E. coli* que apresentaram o peso estimado, aproximadamente 500 pb, e com a presença do fragmento de interesse inserido no plasmídeo. .... 130

**Figura 13.** Extração de DNA plasmidial. Top10+pUC: *E. coli* com o plasmídeo pUC (controle). C2 a C4: Colônias transformadas com a construção CRISPR/Cas9:OsIRO3 inserida no plasmídeo. .... 131

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1.</b> Lista de QTLs detectados para a maior concentração de Fe no grão com o potencial para a biofortificação (SWAMY et al., 2021). .....	48
<b>Tabela 2.</b> Genótipos de arroz ( <i>Oryza sativa</i> L.) utilizados para a quantificação dos elementos essenciais e tóxicos. ....	77
<b>Tabela 3.</b> Concentração elementar em materiais de referência certificado (NIST 1640a e NIST 1568b) e material de referência (Embrapa/USP C1002a), e o viés relativo (%) para cada elemento. Os resultados são expressos com os valores médios $\pm$ desvio de padrão (desvio de padrão relativo), n=6. ....	81
<b>Tabela 4.</b> Limites de detecção ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) do método analítico utilizado para análise de elementos traço em grãos integral e branco de diferentes genótipos de arroz. ....	82
<b>Tabela 5.</b> Resumo da análise de variância para o acúmulo de elementos traço em grãos integral e polido de diferentes genótipos de arroz. ....	84
<b>Tabela 6.</b> Acúmulo de Fe ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) em grãos de arroz integral e polido. Considerando grão integral, médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si. Considerando grão polido, médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si, * e <sup>ns</sup> correspondem a significativo e não significativo, respectivamente, quando se compara grão integral com grão polido dentro de cada safra. ....	86
<b>Tabela 7.</b> Acúmulo de Mn ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) em grãos de arroz integral e polido. Considerando grão integral, médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si. Considerando grão polido, médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si, * e <sup>ns</sup> correspondem a significativo e não significativo, respectivamente, quando se compara grão integral com grão polido dentro de cada safra. ....	90
<b>Tabela 8.</b> Teor médio de cobre (Cu), zinco (Zn) e selênio (Se) ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) em grãos de arroz integral e polido de diferentes genótipos de arroz. A interação entre genótipo x ambiente de cultivo é mostrada no topo. As médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e a mesma letra minúscula na coluna não diferem. A interação entre processamento x ambiente de cultivo é mostrada na parte inferior. As médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e a mesma letra minúscula na coluna não diferem. As médias foram analisadas pelo teste de Scott-Knott ( $p \leq 0,05$ ). ....	95
<b>Tabela 9.</b> Correlação de Pearson entre Cd, Pb, As e Fe, Mn, Cu, Zn, Se nos grãos dos genótipos de arroz. ....	104
<b>Tabela 10.</b> Resumo de QTLs mapeados e mineração de genes para teor de Fe em grãos de arroz integral em um painel diverso cultivado no sul do Brasil. .	112
<b>Tabela 11.</b> Anotação de genes no RAP-DB minerados dentro do QTL mapeado para teor de Fe em grãos de arroz integral em uma coleção de arroz cultivado no sul do Brasil. ....	114

## S mario

<b>Resumo</b> .....	<b>10</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>11</b>
<b>Lista de Figuras</b> .....	<b>12</b>
<b>Lista de Tabelas</b> .....	<b>14</b>
<b>1 INTRODU�O GERAL</b> .....	<b>17</b>
<b>2 Revisão Bibliográfica</b> .....	<b>21</b>
2.1 Arroz.....	21
2.1.1 Origem e caracteriza�o da espécie.....	21
2.1.2 Espécies do gênero <i>Oryza</i> .....	24
2.1.3 Importância social e econ�mica do arroz.....	27
2.2 Elemento ferro.....	28
2.3 Importância do ferro para humanos e plantas.....	28
2.4 Deficiência ou toxidez de Fe em plantas.....	30
2.5 Estratégias de captura�o de ferro pelas plantas.....	32
2.6 Problemas de saúde por deficiência de Fe.....	37
2.7 A técnica de biofortifica�o para elevar teores de Fe no grão.....	39
2.7.1 Fortifica�o por processamento de alimentos.....	39
2.7.2 Estratégia de biofortifica�o agron�mica.....	41
2.7.3 Biofortifica�o genética pelo melhoramento de plantas.....	43
2.7.3.1 Biofortifica�o por melhoramento convencional.....	43
2.7.3.2 Biofortifica�o com auxílio de ferramentas biotecnológicas.....	45
2.7.3.2.1 Mapeamento de QTLs.....	45
2.7.3.2.2 Transgenia.....	49
2.7.3.3 Ferramentas de biologia molecular que podem auxiliar os melhoristas no processo de biofortifica�o.....	59
2.7.3.3.1 Mapeamento Associativo.....	60
2.7.3.3.2 Edi�o gênica.....	61
2.8 Outros micronutrientes e elementos contaminantes encontrados no arroz.	69
<b>3 CAPÍTULO I - Acessando o conteúdo de minerais e elementos tóxicos em gr�os de arroz cultivados no Sul do Brasil</b> .....	<b>73</b>
3.1 Introdu�o.....	73
3.2 Material e Métodos.....	76

3.2.1 Material vegetal.....	76
3.2.2 Quantificação de elementos traço desejados e indesejados em grãos...	78
3.2.3 Análise estatística.....	82
3.3 Resultados e Discussão.....	83
3.3.1 Acúmulo de minerais.....	85
3.3.2 Acúmulo de elementos tóxicos.....	97
3.3.3 Variabilidade genética.....	101
3.3.4 Correlação entre elementos essenciais e elementos tóxicos.....	103
3.4 Conclusões.....	105
<b>4 CAPÍTULO II - Estudo de associação genômica ampla para teor de ferro nos grãos de arroz cultivados no Sul do Brasil.....</b>	<b>107</b>
4.1 Introdução.....	107
4.2 Material e Métodos.....	108
4.2.1 Material vegetal.....	108
4.2.2 Avaliação Fenotípica.....	109
4.2.3 Genotipagem.....	109
4.2.4 Análise de dados e GWAS.....	110
4.3 Resultados e Discussão.....	111
4.4 Conclusão.....	115
<b>5 CAPÍTULO III - Construção de plasmídeo para análise funcional mediada por CRISPR do gene <i>OsIRO3</i>.....</b>	<b>118</b>
5.1 Introdução.....	118
5.2 Material e métodos.....	121
5.3 Resultados.....	129
5.3.1 PCR de colônia.....	129
5.3.2 Sequenciamento do plasmídeo.....	130
5.3.3 Extração de DNA do plasmídeo <i>CRISPR/Cas9:OsIRO3</i> multiplicado.	130
5.4 Conclusões.....	132
<b>Referências Bibliográficas.....</b>	<b>133</b>
<b>7 VITAE.....</b>	<b>187</b>

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

Largamente consumido e cultivado no mundo inteiro, o arroz (*Oryza sativa* L.) é uma cultura alimentícia de elevada importância. Segundo o Instituto Internacional de Pesquisa de Arroz (IRRI), mais de 2,7 bilhões de pessoas dependem de nutrientes oriundos da ingestão diária desse cereal, e até 2025, esse número terá um acréscimo para 3,9 bilhões (DEY et al., 2023). Porém, o arroz é deficiente em qualidade nutritiva, ou seja, apresenta baixa quantidade de elementos essenciais como ferro (Fe) e zinco (Zn), por exemplo (TAN et al., 2020). Dessa forma, pessoas cuja dieta é composta basicamente por arroz tendem a desenvolver problemas sérios de saúde. Por outro lado, em determinadas regiões do mundo, o arroz pode acumular elevadas quantidades de elementos tóxicos, como arsênio (As), cádmio (Cd) e chumbo (Pb) quando cultivado em áreas contaminadas (TAN et al., 2020).

Dentre os minerais, o Fe é importante para diversos processos fisiológicos, e a sua deficiência em seres humanos causa muitos problemas de saúde. Doenças neurodegenerativas, câncer, anemia e defeitos celulares que prejudicam o crescimento são algumas das consequências da deficiência de Fe (CAMASCHELLA et al., 2015; MAJUMDER et al., 2019).

Aperfeiçoar o teor de Fe na dieta proporcionaria a superação dos sintomas associados. Com isso, umas das alternativas seria melhorar a biodisponibilidade de Fe nas culturas através da biofortificação que resultaria em um grande efeito benéfico na saúde humana. O método de biofortificação têm a função de elevar a concentração e/ou a disponibilidade de elementos traços nas culturas ao longo do crescimento e desenvolvimento da planta por meio de vias agrônomicas e genéticas (BOUIS et al., 2011). A biofortificação genética utiliza técnicas tanto de biotecnologia quando métodos de melhoramento convencional, enquanto que a biofortificação agrônômica é resultante do uso da aplicação de fertilizantes no solo e/ou nas folhas da cultura (JIANG et al., 2021). Além de possibilitar a elevação de elementos essenciais, a biofortificação pode ser utilizada para reduzir o acúmulo de elementos tóxicos (CHEN et al., 2017; TONG et al., 2023;

YONEYAMA et al., 2015, ZHOU et al., 2020). Do ponto de vista econômico e ambiental, a biofortificação genética é mais indicada.

A variabilidade genética fornece uma oportunidade de contribuir grandemente com os programas de melhoramento de arroz para diferentes características de interesse agrônomo (CHAKRAVARTHI; NARAVANENI, 2006; VARSHNEY et al., 2008; HUANG et al., 2010; YADAV et al., 2013; ROY et al., 2016; SKIPARS et al., 2021), como a biofortificação de Fe e outros minerais e a redução de elementos tóxicos. Dessa forma, a caracterização do germoplasma local é essencial para estabelecer o potencial de genes superiores, ao mesmo tempo que auxilia em certificar o nível de eficiência do programa (PRYSIAZHNIUK et al., 2020; KARIMAH et al., 2021; SHANINA; LIKHODEYEVSKY, 2021). Com isso, para a realização de cruzamentos para obter genótipos superiores para as características de interesse é fundamental conhecer a variabilidade genética existente no germoplasma. Da mesma forma, a caracterização possibilita identificação de genótipos com elevadas concentrações de minerais essenciais e baixo acúmulo de metais pesados, auxiliando produtores como recomendação de cultivos (BASHIR et al., 2013b; RAWAT et al., 2013; SLAMET-LOEDIN et al., 2015).

O teor de cada elemento traço no grão de arroz é controlado por locos de caracteres quantitativas (QTLs) e é influenciado por condições ambientais. Inúmeros genes responsáveis pelo aumento da concentração de minerais no grão de arroz foram identificados através da genômica funcional (ANDRESEN et al., 2018; BASHIR et al., 2016; HUANG; SALT 2016). Dentre as estratégias para identificação de regiões genômicas que controlam características de interesse agrônomo está o estudo de associação de genômica ampla (GWAS), que permite usufruir o máximo os eventos de recombinação antigas para dissecar locos genéticos associados a características complexas em uma resolução relativamente alta (TAN et al., 2020). O GWAS possibilita identificar pequenas variações genéticas que afetam as características complexas em plantas cultivadas (NANDHINI et al., 2021). Dessa forma, o GWAS é uma ferramenta que contribui tanto para técnicas de transgenia como edição gênica, uma vez que, permite a identificação de sequências responsáveis pelas características de interesse.

A edição de genomas é uma opção para gerar genótipos superiores com acúmulo de minerais nos grãos de cereais pelo meio de inserções, deleções ou substituições de nucleotídeos (ZHU et al., 2017). No caso da deleção seguido por reparo por junção final não homóloga, a edição promove o silenciamento e nocautes de genes (ZHANG et al., 2016).

Dentro desse contexto, esse trabalho teve como objetivo a caracterização de genótipos de arroz quanto ao acúmulo de minerais e elementos tóxicos no grão, mapeamento de sequências responsáveis pelo acúmulo de Fe em grãos e a construção de um plasmídeo de edição de um gene envolvido no metabolismo do Fe.

## **2 Revisão Bibliográfica**

## 2 Revisão Bibliográfica

### 2.1 Arroz

#### 2.1.1 Origem e caracterização da espécie

O processo de domesticação de plantas e animais é determinado como um dos marcos mais relevantes na história do *Homo sapiens* (DIAMOND, 2002). Aproximadamente há 12.000 anos atrás, posterior ao último período glacial, e desde começo do Holoceno, as sociedades de caçadores e coletores iniciaram o cultivo de espécies vegetais para fornecer a energia necessária para a dieta humana (revisado por AKAGI et al., 2022). Esse processo levou a domesticação das plantas, possibilitando a sobrevivência humana (DIAMOND, 2002; LARSON et al., 2014). Estima-se que se encontra entre 1000 e 2500 espécies de plantas semi ou por completo domesticadas, sendo entorno de 120 a 160 famílias taxonômicas (MEYER et al., 2012; MILLA et al., 2018). Todas essas espécies são relativamente jovens, devido sua origem ser recente, desde o período neolítico, e em algumas situações, possivelmente existindo por somente poucos séculos (PURUGGANAN, 2019).

No período neolítico os primeiros cereais cultivados foram o trigo (*Triticum aestivum* L.) e a cevada (*Hordeum vulgare*), por volta de 12.000 anos atrás. Já o arroz (*Oryza sativa* L.) foi domesticado cerca de 9.000 anos atrás a partir de *Oryza rufipogon* (LI et al., 2022). Dados culturais demonstram que o arroz era uma planta sagrada do imperador chinês e era considerado um símbolo de fartura para alguns povos orientais, sendo usado em cerimônias (CONAB 2015, MAGALHÃES, OLIVEIRA, 2008; AHIRWAR; MOHABE, 2022). O gênero inclui espécies anuais ou perenes, semiaquática e com adaptação sob distintas condições edafoclimáticas (HEMAMALINI et al., 2000; TERRA et al., 2013). O arroz é uma cultura muito importante no mundo, pois além de apresentar elevada produtividade, grande produção e fazer parte da dieta de grande parte da

população, possuiu genoma pequeno, sendo considerado modelo entre as gramíneas (NAYAR, 2014; revisado por GU et al., 2022).

O arroz pertence a divisão das angiospermas, à família *Poaceae*, tribo *Oryzae* e gênero *Oryza* (NCBI, 2022). A evolução das tribos das gramíneas parece ter derivado de um ancestral com  $x = 6$  cromossomos, porém evidências mostram que caminhos distintos foram tomados, como redução, supressão e modificação de cromossomos (MAGALHÃES, JR.; OLIVEIRA, 2008). A tribo *Oryzae* é considerada diploide, com o número básico  $x = 12$  cromossomos, acreditando-se que houve um processo de duplicação em relação ao ancestral (TERRES et al., 1998).

Na tribo *Oryzae*, o *Oryza* é o único dos 11 gêneros que apresenta apenas duas espécies cultivadas, o *Oryza sativa* L. (arroz asiático) e *Oryza glaberrima* S. (arroz africano), dentre as 27 espécies que possui. As espécies desse gênero abrangem ~ 15 milhões de anos de processos evolutivos, com 11 tipos de genoma, sendo 6 diploides ( $x = 12$ : AA, BB, CC, EE, FF e GG) e 5 tetraploides ( $x = 24$ : BBCC, CCDD, HHJJ, HHKK e KKLL) (STEIN et al., 2018). O arroz asiático e o arroz africano ambos contêm o número básico de 12 cromossomos ( $x = 12$ ) e são diploides ( $2n = 24$ ). No entanto, existe a diferença na representação dos genomas, sendo o *O. sativa* com AA e o *O. glaberrima* com AG AG, (MAGALHÃES; OLIVEIRA, 2008). Essas espécies obtiveram domesticação independentes, *O. sativa* a partir de *O. rufipogon* no continente asiático e *O. glaberrima* a partir de *O. barthii* no continente africano (revisado por WIN et al., 2016).

Através de relatos históricos, escavações arqueológicas e dados geográficos, o centro de origem de *O. sativa* L., é supostamente, localizado no sudoeste da Ásia, precisamente perto das margens dos rios Yangtze e Mekong. Há indícios que centros de diversidades foram identificados em regiões específicas no Estado de Chhattisgarh, perto das costas das montanhas do Himalaia, Jeypore trato da Odiséia, no nordeste da Índia, norte de Mianmar e Tailândia e Província na China (SINGH; UPADHYAYA, 2016; XUE et al., 2022).

O gênero *Oryza* apresenta características peculiares das flores e suas estruturas reprodutivas, as quais beneficiam a produção de grãos. As espiguetas

são compostas por pares de glumelas florais chamadas de pálea e lema, com a presença de seis estames férteis, um estigma bifido funcional e duas glumelas estéreis situadas na base da flor. Esse par de glumelas florais tem o papel fundamental de proteger a semente de estresses bióticos e abióticos, e podem mostrar um alongamento conhecido como arista, sendo uma estrutura que tem a função de dispersão da espécie. Esse conjunto de espiguetas estão presos no pedicelo, e o conjunto do mesmo formam a estrutura chamada de panícula, que por sua vez, é considerada a inflorescência do arroz (PEREIRA, 2002; SOUZA et al., 2015; VAUGHAN et al., 2003). As características morfológicas do gênero são folhas estreitas com nervuras lineares e bordos serrilhados, glumas estéreis rudimentares, raízes adventícias e fibrosas, com a presença de afilhos que são colmo ocos, e uma panícula principal (VAUGHAN; MORISHIMA; KADOWAKI, 2003).

Sabe-se que *O. sativa* L. é classificado em sete grupos, *indica*, *japonica temperada*, *japonica tropical*, *aus*, *ashina*, *rayana* e *aromatico* (GLASZMANN, 1987; WANG et al., 2014). Devido a evolução e a domesticação da cultura, através de seleção natural e artificial, duas grandes subespécies foram formadas, *indica* e *japonica*, apresentando grande divergência genética, morfológica e fisiológica entre si (CHANG et al., 2003; MATSUO et al., 1997; YU et al., 2013; revisado por WEI et al., 2019). Dados arqueobotânicos tem sugerido que o *O. sativa* subespécie *japonica* foi domesticada pela primeira vez há aproximadamente 7000 anos, nas margens da bacia de Yangtze localizada na China, enquanto que a *O. sativa* subespécie *indica* obteve a sua domesticação há aproximadamente 4000 anos, nas planícies situadas no Ganges na Índia (revisado por CHOI; PURUGGANAN, 2018; FULLER et al., 2010; GUTAKER et al., 2020).

As principais diferenças entre as subespécies *indica* e *japonica* encontram-se nas respostas a estresses bióticos e abióticos, como resistência a brusone e outras doenças que afetam a cultura, tolerância a baixas temperaturas e a seca (revisado por PANG et al., 2023). Assim como, habilidade competitiva quando submetidas em condições climáticas modificadas, resposta do acamamento quando utilizado o nitrogênio como fertilizante, germinação em baixas temperaturas e a eficiência da fotossíntese da planta com a mesma

quantidade de proteína (MACKILL et al., 1996; OKA; MORISHIMA, 1997). A identificação visual de cada subespécie é baseada na forma dos grãos. Quando forem curtos, grossos e largos se refere a subespécie *japonica*, enquanto que se forem longos, finos pertencem à subespécie *indica* (CHANDRARATNA, 1964; WATANABE, 1997).

### 2.1.2 Espécies do gênero *Oryza*

A tribo *Oryzae* é composta por 11 gêneros, sendo os *Oryza* L. e *Leersia* SW os maiores (revisado por KELLOGG, 2009). Estudos analisando genes nucleares e do genoma dos cloroplastos apontaram que *Oryza* e *Leersia* são irmãos, no qual divergiram dos outros gêneros entorno de 20,5 milhões de anos atrás, e a divergência entre eles ocorreu há aproximadamente 14,2 milhões de anos atrás (GE et al., 2002; GUO e GE, 2005; MENGUER et al., 2017).

Um estudo filogenômico com 142 genes foi feito para ver a relação de todas as espécies do gênero *Oryza* (ZOU et al., 2008). Essa pesquisa revelou dois eventos de especiação, que ocorreram há cerca de cinco e dez milhões de anos atrás, resultando em toda a diversidade existente no gênero. O primeiro episódio aconteceu há dez milhões de anos atrás, com uma divergência do genoma G, F, e uma forma ancestral que deu origem aos demais genomas do *Oryza* (GUO e GE, 2005), e o H, J e K que divergiram e existem somente em espécies tetraploides (GE et al., 1999; GUO e GE, 2005). O segundo episódio, que ocorreu há cinco milhões de anos, promoveu a especiação dos genomas A, B e C, demonstrando que os genomas A e B são irmãos e o genoma C irmão desse clado (KELLOGG, 2009; MENGUER et al., 2017; ZOU et al., 2008).

A espécie *O. sativa* L. é oriunda do ancestral silvestre *O. rufipogon*, enquanto que o arroz africano *O. glaberrima* é derivado do ancestral anual *O. barthii*. Há indícios que há aproximadamente 0,86 milhões de anos atrás as duas espécies cultivadas, com os seus respectivos genitores, compartilharam um ancestral desconhecido até então (SARLA; SWAMY, 2005; ZHU et al., 2014). A espécie *O. glumaepatula* do grupo do genoma A apresenta distribuição atual na

América Latina, e é caracterizada por obter uma forte associação entre distâncias genéticas e geográficas, sugerindo que sua utilização foi principalmente feita por tribos locais sem permuta de sementes entre tribos distantes (JACQUEMIN et al., 2013; VAUGHAN et al., 2003; MENGUER et al., 2017).

Porém existe alguns conflitos na árvore genética, não podendo ser entendidos apenas pela separação incompleta dos estirpes. Como base nos cromossomos 6 e 12, sugere-se que a espécie *O. glumaepatula*, pertencente ao grupo de genomas AA da América do Sul, é irmã de *O. barthii* e *O. glaberrima*, os africanos, ao invés dessas duas espécies mais o complexo de *O. sativa*, como mencionado na árvore do genoma inteiro do gênero *Oryza* (STEIN et al., 2018). No entanto, o fluxo gênico passado entre todas as espécies do grupo AA, conseguem ser detectadas até então. Há evidência que em regiões houve introgressões em todos os cromossomos, sendo que em dez foram significativos entre *O. glumaepatula* e as espécies africanas, todavia não para os asiáticos (DURAND et al., 2011; revisado por STEIN et al., 2018; revisado por ALSANTELY et al., 2022)

Para o *O. sativa* L., dois cenários de domesticação interativos foram propostos para o surgimento das subespécies *indica* e *japonica*. O primeiro, determinado como “modelo bola de neve” sugere a criação de um genótipo inicial com o agrupamento de características de domesticação, através de um único episódio de domesticação. E quando feito o cruzamento com as espécies silvestres de arroz, teria ocorrido a fixação dos alelos críticos de domesticação divididos em cada subespécie. O outro é “modelo de combinação” que indica que as subespécies foram domesticadas de forma independente a partir de inúmeros ecótipos de arroz, com a realização de hibridações, ocorrendo o processo de introgressão e fixação dos alelos de domesticação (revisado por MENGHER et al., 2017; SANG; GE, 2007).

Pelos estudos dos dados arqueológicos e genéticos que estão à disposição, sugere-se que o “modelo de combinação” é o mais cabível considerando os acontecimentos da domesticação da cultura do arroz asiático (GROSS; ZHAO, 2014). Percebe-se que a espécie *O. nivara* é mais próxima, com características semelhantes do arroz cultivado do que *O. rufipogon*. Há a

possibilidade de *O. nivara* ter sido o genitor da subespécie *indica* e a domesticação apresentaria menores alterações genéticas ou transições no sistema de hibridação (LI et al, 2006; SANG; GE, 2013). Se a hipótese for certa, haveria menos impacto na seleção para *indica* devido *O. nivara* conter caracteres de arroz cultivado. Com isso, os alelos fundamentais de domesticação apareceram no período de domesticação da subespécie *japonica* a partir de *O. rufipogon*. A subespécie *indica* semi-domesticada foi responsável por ser o destinatário principal dos alelos de domesticação quando a subespécie *japonica* veio transportada para a Índia (revisado por MENGHER et al., 2017; SANG; GE et al., 2013; VAUGHAN et al., 2008).

Pela existência de 27 espécies determinadas no gênero *Oryza*, a vasta fonte de genes não é totalmente conhecida (revisado por ALSANTELY et al., 2022). Porém é uma oportunidade de buscar a variabilidade genética em ancestrais do arroz cultivado, que foram deixados de lado, pelas seleções artificiais e naturais ao longo das décadas, mas que apresentam um grande potencial para a obtenção de genótipos superiores (MENGHER et al., 2017). Sabe-se que no grupo do genoma AA as espécies *O. meridionalis*, *O. longistaminata*, *O. glaberrima* e *O. barthii* são indicados como candidatos à tolerância à seca e ao calor com base na distribuição em umidade e temperaturas extremas (ATWELL et al., 2014). A espécie *O. punctata*, tanto do grupo do genoma BB (diploide) quanto do genoma BBCC (alotetraplóide), apresenta potenciais reservatórios gênicos para a tolerância à estresse por déficit hídrico, apontada também pela plasticidade de condições supremas de umidade (ATWELL et al., 2014). Para as espécies do grupo dos genomas CCDD, *O. grandiglumis* e *O. latifolia* são determinadas como candidatas ao estresse causado por inundação (ATWELL et al., 2014; LU et al., 2009). No grupo do genoma GG a espécie *O. granulata* é considerada um potencial recurso genético para a tolerância por baixas temperaturas (AGGARWAL et al., 1997; ATWELL et al., 2014; VAUGHAN et al., 2003). E a espécie *O. coarctata*, do grupo de genoma KKLL apresenta grande potencial para a tolerância à salinidade. Por fim, as espécies *O. ridleyi* e *O. schlechteri*, dos grupos HHJJ e HHKK, respectivamente, são candidatas para tolerância à inundações (ATWELL et al., 2014; LU et al.,

2009; revisado por MENGHER et al., 2017; SENGUPTA; MAJUMDER et al., 2010; revisado por KAIRAM; SRAN, 2022).

### **2.1.3 Importância social e econômica do arroz**

Ao longo dos anos, a cultura ganhou espaço no mercado, se destacando entre os três alimentos mais produzidos e consumidos em nível mundial. O arroz é um dos principais responsáveis não apenas na luta para combater a fome que afeta milhões de pessoas, mas também no fornecimento de renda e emprego (FAO, 2014; MONACO; SALI, 2018; ISMALIA; TANKO, 2021).

O arroz é o terceiro cereal mais produzido do mundo, com uma produção de 510 milhões de toneladas na safra 2021/2022. A maior área produzida encontra-se na Ásia, sendo a China o líder do ranking, com produção de 148,990 milhões de toneladas (USDA, 2022). O Brasil, mesmo apresentando produção inferior quando comparado aos países asiáticos, ocupa a nona posição. O País destaca-se no continente americano, com a maior estimativa de produção para a safra 2022/2023, com 10,4 milhões de toneladas, da qual o Rio Grande do Sul é responsável por cerca de 90%, com uma produtividade de 8,6 toneladas por hectare (CONAB, 2022). O cultivo no sistema irrigado apresenta rendimento bem elevado se comparado com o sistema de sequeiro, pois à cultura se adapta melhor ao ambiente irrigado devido as características fisiológicas específicas da planta (STRECK, 2017).

O arroz compõe a dieta humana, contribuindo com 20% das calorias, o que acarreta uma constante procura por métodos eficientes para o incremento no rendimento (SOSBAI, 2018; revisado por SINGH et al., 2021). Contudo, a cultura é uma fonte pobre de nutrientes, e nos países subdesenvolvidos, em que há carência de alimentos e o arroz é um alimento básico, ocorre problemas de desnutrição, fazendo-se a necessidade de elevar a qualidade nutricional desse cereal (BILALI et al., 2017; TILMAN et al., 2011; STROBBE et al., 2021). Algumas alternativas podem auxiliar na minimização da deficiência de vitaminas e minerais, sendo uma delas a biofortificação, que por sua vez atua no

desenvolvimento de genótipos agronomicamente superiores quanto ao teor de micronutrientes. Essa estratégia, além de ser eficiente na redução da desnutrição populacional, e conseqüentemente, diminuir o aparecimento e mortes causadas pela falta de nutrientes necessários, é de baixo custo, viabilizando a sua utilização em países pobres, sendo considerada uma ferramenta sustentável (BOUIS; SALTZMAN, 2017; REIS et al., 2013; STROBBE et al., 2021).

## 2.2 Elemento ferro

Os minerais são considerados constituintes químicos ou também conhecidos como substâncias inorgânicas encontradas em todo o corpo, geralmente em tecidos e fluidos que são essenciais para os processos vitais e sobrevivência dos organismos (ERUVBETINE, 2003; MALHOTRA, 1998; SOETAN et al., 2010; revisado por ALAGAWANY et al., 2021). Dentre eles, são classificados como macro elementos e micro elementos, devido as quantidades diárias requeridas ser acima 100 mg/dia e abaixo de 100mg/dia, respectivamente (BHATTACHARYA et al., 2016). Exemplos de macro minerais incluem cálcio, fósforo, sódio e cloreto, enquanto que micro minerais são ferro, magnésio, zinco, cobre, manganês, cobalto, potássio, molibdênio, iodo, fluoreto, cromo, selênio e enxofre (ERUVBETINE, 2003; SOETAN et al., 2010).

O ferro (Fe), por sua vez, é um elemento de grande abundância na terra (ABBASPOUR et al., 2014; NEMETH; GANZ, 2021; QUINTERO-GUTIÉRREZ et al., 2008; WOOD et al., 2005), constitui 4,4% de rochas sedimentares, 4,6% de rochas ígneas e 4,7% na forma de hematita, magnetita e siderita (BEARD et al., 1996; MOREL; HERING, 1993). Contudo, mesmo com essa grande quantidade geológica, o Fe frequentemente é considerado um fator limitante para o crescimento dos seres vivos no ambiente (QUINTERO-GUTIÉRREZ et al., 2008). Isso deve-se ao fato de que quando o Fe entra em contato com o oxigênio, resulta em óxidos insolúveis, tornando-o indisponível para absorção pelos organismos (ABBASPOUR et al., 2014; WOOD et al., 2005; revisado por CHAI et al., 2022).

### 2.3 Importância do ferro para humanos e plantas

Por relatos históricos, desde a antiguidade, os seres humanos reconheceram a importância da função do Fe em questões de saúde e combate a doenças (BEARD et al., 1997). Os povos árabes, chineses, gregos, romanos, egípcios e hindus atribuíram propriedades terapêuticas do Fe como uso medicinal. Os gregos utilizavam para auxiliar no tratamento de soldados feridos, para a melhora de fraqueza muscular provocada por uma anemia hemorrágica (MCDOWELL et al., 2003; VANNOTTI et al., 1949; WOOD et al., 2005).

Em meados do século XVII o Fe foi indicado para tratamento de uma doença chamada clorose (doença verde), conhecida também como anemia hipocrômica, geralmente causada pela deficiência de Fe (GUGGENHEIM 1995; HUGHES et al., 1977). Após a descoberta que o Fe era constituinte do fígado e sangue em animais (MCCAY, 1973; MCCOLLUM, 1957; VANNOTTI et al., 1949), finalmente foi comprovado que esse elemento inorgânico é essencial para a síntese de hemoglobinas (ABBASPOUR et al., 2014; YIP et al., 1996).

Durantes anos, o Fe era considerado fundamental apenas para a formação de hemoglobinas e mioglobinas no transporte de oxigênio (UNDERWOOD et al., 1999; NGUYEN et al., 2022). A baixa ingestão e/ou biodisponibilidade de Fe é responsável por grande parte das anemias em países em desenvolvimento, e metade das anemias em países de primeiro mundo (ABBASPOUR et al., 2014; ALLEN et al., 2006; BRABIN et al., 2001). Aproximadamente dois terços do Fe contido no corpo humano está abrigado na hemoglobina dos glóbulos vermelhos, que apresenta o papel de transportar oxigênio dos pulmões para o resto do corpo, sendo essa a sua função principal (WESSLING-RESNICK, 2017; MANSOUR et al., 2021). Contudo ele apresenta outros papéis importantes como transporte de elétrons, por exemplo heme tal qual o citocromos a, b e c, o citocromo P450 e mioglobinas, que são fundamentais na respiração das mitocôndrias e para a síntese de ATP (GORDON, 2003). E também no metabolismo oxidativo referentes as enzimas compostas de ferro-enxofre, especialmente as NADH desidrogenase, e a prolif-

hidroxidase, citocromo-oxidase e tirosina-hidroxilase que necessitam do ferro para realizar a sua atividade catalítica (BLOMBERG; SIEGBAHN, 2003; LEVENSON; TASSABEHJ, 2004; RAMSEY et al., 1996; VRANKA et al., 2004; WESSLING-RESNICK, 2017).

Nas plantas o Fe atua nos processos de fotossíntese, respiração e biossíntese de clorofila (CURIE; BRIAT, 2003; SPEROTTO et al., 2010b; GAO; DUBOS, 2021). Também é um cofator fundamental nas enzimas, promovendo as reações de transferência de elétrons ou oxigênio (revisado por KOBAYASHI et al., 2019). Além disso, participa na produção de fitohormônios e na síntese de DNA, permitindo um melhor crescimento e desenvolvimento da planta (STAFEN, 2018). Por fim, está envolvido na reação de Fenton, que é determinada por catalisar a produção de radicais hidroxilas (OH), que são espécies reativas de oxigênio (ROS), responsáveis por provocar prejuízos irreversíveis na célula (WU et al., 2014; CARTER et al., 2022). Porém, concentração de Fe na planta deve ser ideal, ou seja, é necessário um equilíbrio, pois tanto a deficiência como o excesso desse mineral, são prejudiciais para a produção e desenvolvimento da planta (revisado por WAIRICH et al., 2019).

## **2.4 Deficiência ou toxidez de Fe em plantas**

A deficiência de Fe nas plantas causa sintomas como o surgimento de clorose, diminuição na biomassa, alterações na arquitetura da raiz, e impacto na produtividade, além de afetar o valor nutritivo nos grãos (GUERINOT et al., 1994a; KOBAYASHI; NISHIZAWA, 2014; MORRISSEY; GUERINOT, 2009; ZHAO et al., 2022). Grande parte dos problemas de deficiência de Fe ocorre em solos calcários, que compõem cerca de um terço da superfície da Terra, onde ocorre baixa biodisponibilidade do Fe para as plantas (GUERINOT et al., 1994b; KERKEB et al., 2006; ZEBEC et al., 2021).

No cultivo de arroz pelo sistema irrigado, que por sua vez, o solo contém uma lâmina de água contínua, e é caracterizado por apresentar condições de anaerobiose, se o pH for baixo, alto teor de Fe disponível começa a ser liberada

na solução do solo. Essas características devidas as condições desse ecossistema de cultivo provocam principalmente a redução da forma férrica do ferro ( $\text{Fe}^{3+}$ ) para a forma ferrosa ( $\text{Fe}^{2+}$ ), elevando os níveis disponíveis, ocasionando problemas de toxidez por excesso de ferro na cultura (SCHMIDT et al., 2013; VIANA et al., 2022).

A toxidez por Fe, é um dos principais estresses abióticos no mundo, e causam perdas irreparáveis na produtividade em lavouras de arroz situadas em países asiáticos, do oeste africano e sul-americanos (SHAHID et al., 2014; PAWAR et al., 2021). No Rio Grande do Sul, esse estresse por toxidez pelo excesso de Fe foi relatado pela primeira vez, em meados do fim da década de setenta, quando as cultivares modernas foram introduzidas no mercado e cultivadas pelos produtores (MAGALHÃES JR. et al., 2009).

O estresse causado pelo excesso de Fe é uma desordem nutricional que pode ocorrer de duas maneiras, por toxidez direta ou toxidez indireta. A toxidez direta ocorre pela excessiva absorção de Fe pela planta. Por outro lado, a toxidez indireta se caracteriza pela deficiência geral de outros nutrientes devido as elevadas concentrações do Fe solúvel nas raízes (VAHL, 1991). A forma de toxidez que mais afeta o arroz cultivado no Brasil, é a toxidez indireta.

A toxidez indireta por ferro tem como resultado a restrição de absorção de inúmeros nutrientes essenciais pelas plantas, sendo elas o cálcio, nitrogênio, magnésio, potássio, fósforo e o próprio ferro. Isto ocorre pela precipitação do Fe sobre a epiderme das raízes formando uma capa férrica. A capa é constituída por uma camada de óxido de ferro que impede os sítios de absorção de nutrientes nas raízes. Esse processo ocasiona uma carência nutricional múltipla, e conseqüentemente, um amarelecimento das folhas, que expressa do ápice para base, além disso o espessamento e a suspensão da atividade das raízes (LANTIN; NEUE, 1989; YOSHIDA, 1981).

Nos estádios iniciais da cultura, a toxidez por excesso de ferro promove um retardo no crescimento e desenvolvimento da planta, e reduz o perfilhamento. Já nos estádios vegetativo e reprodutivo, ocorre a produção de panículas menores e uma elevada presença de espiguetas estéreis, com isso, provocando a diminuição na produção de grãos (LANTIN; NEUE, 1989;

YOSHIDA, 1981). Quando observa-se as raízes nesses estádios, são caracterizadas como ásperas, escassas e com uma coloração alaranjada (CAMARGO, 1984; SAHRAWAT, 2004; ZAHRA et al., 2021). No entanto, é importante ressaltar que registros de perdas anuais de até 30% no rendimento da cultura ocorreu sem a presença dos sintomas toxicológicos nas folhas (ABIFARIN, 1988; revisado por LAHO et al., 2022).

## 2.5 Estratégias de captação de ferro pelas plantas

Para transformar o Fe localizado no meio ambiente em formas biologicamente úteis, inúmeros mecanismos celulares de resposta foram adaptados (GUERINOT, 1994b). Um desses mecanismos é a redução de ferro férrico insolúvel ( $\text{Fe}^{+3}$ ) para a forma ferro ferrosa solúvel ( $\text{Fe}^{+2}$ ), observada inicialmente em leveduras (ASKWITH et al., 1998). Esses mecanismos de resposta também são encontrados contraparte análogos em organismos superiores, desde plantas, animais e em seres humanos (ABBASPOUR et al., 2014).

A maioria das plantas desenvolveram mecanismos de captação de Fe com o objetivo de absorver a quantidade ideal e evitar a toxicidade e/ou deficiência (WELCH, 2002). Porém, a captação de Fe é dependente da disponibilidade de Fe, que é influenciado pelo pH e potencial redox do solo (revisado por KOK et al., 2018; MORRISSEY et al., 2009; revisado por GAUTAM et al., 2021). As plantas apresentam duas estratégias para captação de Fe do solo. A estratégia I é baseada em processos de redução, e ocorre em plantas superiores exceto as da família *Poaceae*. A estratégia II, é baseada em um processo de quelatção, e está presente nas espécies da família *Poaceae* (ISHIMARU et al., 2006; WIRTH et al., 2009). O arroz é uma exceção, e apresenta a capacidade de utilizar ambas as estratégias de captação de Fe (KOK et al., 2018; revisado por LI et al., 2023).

Na estratégia I ocorre a redução da forma férrica ( $\text{Fe}^{3+}$ ), indisponível, para a forma ferrosa ( $\text{Fe}^{2+}$ ), considerada disponível e solúvel, antes de ser absorvido

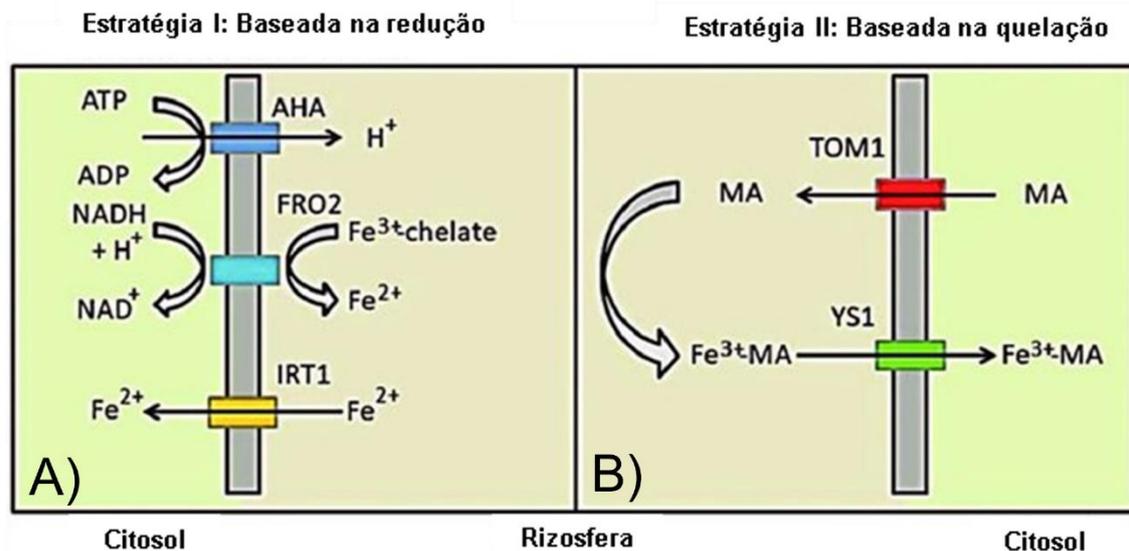
pelas raízes da planta. Nessa estratégia, primeiramente é feita a liberação de prótons na rizosfera, realizada pelas ATPases (AHA2 – H<sup>+</sup>ATPase), com o intuito de provocar a redução do pH da solução do solo. A acidificação do pH do solo facilita a absorção do Fe pelas raízes das plantas (KIM; LOU, 2007). Em seguida, Fe<sup>3+</sup> quelato redutase que é dependente do NADPH, promove a redução do Fe<sup>3+</sup> oxidado para a forma Fe<sup>2+</sup>, com o auxílio da enzima redutase férrica oxidase 2 (FRO2 – *Ferric Reductase Oxidase*). Finalmente, os transportadores de íons férricos, controlados pelos transportadores regulados por ferro 1 (IRT1- *Iron Regulated Transporter 1*), levam o Fe<sup>2+</sup> para interior das raízes (Figura 1) (ISHIMARU et al., 2006; KIM; KOK et al., 2018; LOU, 2007; revisado por REHMAN et al., 2021).

Os genes que codificam as enzimas AHA2, FRO2 e IRT1, que atuam na estratégia I de captação de ferro, são regulados por diferentes fatores de transcrição (FT). Em plantas submetidas a baixa disponibilidade de Fe no solo, os FTs induzidos pela deficiência de ferro (*iron deficiency-induced transcription factor* – FIT) juntamente com os FTs da família Hélice-volta-hélice básico (*Basic-helix-loop-helix* - bHLH), regulam diretamente a expressão dos genes *IRT1* e *FRO2*, induzindo a maior captação de Fe (LI et al., 2023).

Os genes *FIT*, por sua vez, apresentam uma regulação positiva por moléculas sinalizadoras como os fitohormônios auxina e etileno, elevando a síntese dos mesmos em plantas submetidas na condição de baixa disponibilidade de Fe (SANTOS et al., 2017). O FIT se relaciona com os FTs insensível ao etileno 3 (*AtEIN3*) e insensível ao etileno 3-like1 (*AtEIL1*), demonstrando que a sinalização do fitohormônio etileno é fundamental para a resposta quanto há insuficiência de Fe na planta (LINGAM et al., 2011; revisado por SANTOS et al., 2017). O óxido nítrico também apresenta um aumento da sua síntese quando a planta está sob condição de baixo teor de Fe no solo, regulando assim, genes que são fundamentais na captação desse elemento (HINDT; GUERINOT, 2012; SINGH; BHATLA, 2022).

Outro FT codificado pelo gene *Popeye* (*AtPYE*), e uma ubiquitina ligase E3, codificada pelo gene *Brutus* (*AtBTS*), ambos identificados em *Arabidopsis thaliana*, atuam na regulação da absorção de Fe, principalmente na sinalização

da resposta radicular quanto a disponibilidade do mesmo, e na regulação da homeostase do Fe (LONG et al., 2010; LIANG, 2022).



**Figura 1.** Captação de Fe pelas plantas. A: Estratégia I ou estratégia baseada em redução na captação de ferro. B: Estratégia II ou estratégia baseada em quelatção na captação de ferro.

**Fonte:** adaptado de KOK et al., 2018.

Na estratégia II ocorre a captação do  $Fe^{3+}$  através da quelatção do mesmo com fitosideróforos solúveis (FS), alocando  $Fe^{3+}$  quelado localizado na rizosfera em direção ao interior das células das raízes. É realizada principalmente quando a planta está em condição de deficiência de Fe. Essa estratégia ocorre em plantas da família das gramíneas como em milho, trigo e arroz (KOK et al., 2018). Inicialmente são liberados fitosideróforos (PSs), compostos derivados da família do ácido mugineicos (MA), que são considerados quelantes naturais e com baixo peso molecular, apresentam grande afinidade com  $Fe^{3+}$  e logo quelando o mesmo na rizosfera (HELL; STEPHAN, 2003; WHO, 2015). Dependendo de cada espécie, distintos conjuntos de MAs vão ser liberados na rizosfera da planta, por meio de transportadores de MAs (TOM1), para solubilizar o  $Fe^{3+}$  concentrado na rizosfera. Posteriormente os MAs se ligam com  $Fe^{3+}$ , formando eficientemente complexos  $Fe^{3+}$ -MA, que serão deslocados para a raiz via transportadores *Yellow Stripe – Like* (YSL) (Figura 1) (ISHMARU et al., 2006; KOK et al., 2018; SWAMY et al., 2021; WIRTH et al., 2009; LI et al., 2023).

As enzimas envolvidas na estratégia II atuam em três etapas, precursores dos fitosideróforos, síntese dos PSs e no transporte do complexo  $\text{Fe}^{3+}$ -MA. As enzimas 5'- metiltioadenosina nucleosidase (MTN), metiltioribose quinase (MTK), metiltioribose-1-fosfato isomerase (IDI2), desidrase enolase fosfatase (DEP) e S-adenosil-metionina-L-metionina-sintetase (SAMS) atuam na primeira etapa, no ciclo dos precursores dos metionina e S-adenosil-metionina (KOBAYASHI et al., 2005; SUZUKI et al., 2006). Na segunda etapa, para síntese de PS é necessário o papel das enzimas nicotianamina sintase (NAS), nicotianamina aminotransferase (NAAT), ácido deoximugineico sintase (DMAS) e dioxigenases (IDS2/IDS3) (NAKANISHI et al., 2000; KOBAYASHI; NISHIZAWA, 2012). E a última etapa, *Yellow Stripe 1* (YS1) e YLS, para o transporte do complexo  $\text{Fe}^{3+}$ -MA para as raízes (CURIE et al., 2001; INOUE et al., 2009; KOBAYASHI; NISHIZAWA, 2012; LEE et al., 2009a; revisado por SANTOS et al., 2017).

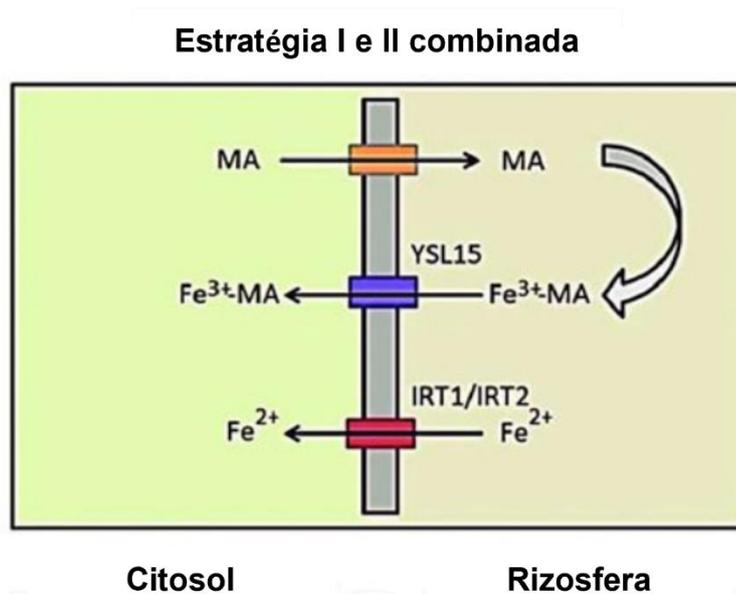
Para síntese de MAs é feita a formação da nicotianamina (NA) através da trimerização de S-adenosil metionina, também catalisada pela NAS (HIGUCHI et al., 1999). Além disso a conversão da NA no intermédio-3-ceto é realizada através da transferência do grupo amino pela NAAT, e a síntese de ácido 2-desoximugineico (DMA) pelo DMAS (BASHIR et al., 2006). Geralmente o primeiro MA sintetizado é utilizado na rota para gerar o DMA, porém outras espécies de gramíneas podem secretar e gerar outras formas de MAs (WAIRICH, et al., 2019; revisado por MATRES et al., 2021).

Os fatores de transcrição denominados Fator de ligação ao elemento 1 responsivo a deficiência de ferro (*Iron deficiency responsive element binding factor 1* - IDEF1 e IDEF2) e Hélice-volta-hélice básico regulado por ferro (*Iron regulated basic helix-loop-helix* - IRO2), foram descobertos como reguladores de genes responsáveis pela absorção do Fe, dentre eles os envolvidos na síntese de PSs em arroz (ITAI et al., 2013). Em condições de baixa disponibilidade de Fe, o FT *OsIDEF1* regula positivamente os genes relacionados na absorção e utilidade do Fe em arroz, como por exemplo *OsIRO2*, *OsYSL15*, *OsYSL2*, *OsIRT1*, *OsNAS1*, *OsNAS2* e *OsNAS3* (KOBAYASHI et al., 2009). O IDEF1 interage com o elemento 1 responsivo a deficiência de ferro (*cis* IDE1), no mesmo momento que o IDEF2 se liga ao IDE2, os dois localizados na região

promotora dos genes relacionados a captação de Fe (KOBAYASHI et al., 2007; OGO et al., 2008; revisado por SANTOS et al., 2017; LI et al., 2023).

Existem algumas peculiaridades em gramíneas, como o arroz, que utiliza as estratégias I e II de forma combinada para a absorção de ferro. (KIM e LOU, 2007; revisado por REHMAN et al., 2021). A explicação mais provável é pela presença da característica adaptativa, pois quando cultivado em ambiente submerso e anaeróbico, a disponibilidade de  $\text{Fe}^{2+}$  é muito maior que  $\text{Fe}^{3+}$  (SPEROTTO et al., 2012a). Assim, na estratégia de quelação ocorre a liberação das MAs na rizosfera, ligando-se com o  $\text{Fe}^{3+}$  para formar o complexo  $\text{Fe}^{3+}$ - MA, que serão captados pela raiz através dos YSL15. E o  $\text{Fe}^{2+}$  é adquirido pelas raízes via IRT1 e IRT2 diretamente do ambiente. O arroz apresenta a capacidade de absorver ferro de forma mais eficiente via complexos  $\text{Fe}^{3+}$ - MA em comparação com a absorção direta do  $\text{Fe}^{2+}$  (Figura 2) (ISHIMARU et al., 2006; revisado por KOK et al., 2018; revisado por LIANG et al., 2023).

Tanto na estratégia I como a II, a NA apresenta a função de quelante de metal para trafegar metais dentro da célula, e também para o transporte de grandes distâncias entre órgãos diferentes, inclusive quando o transporte do Fe é feito pelo floema. Em plantas da família *Poaceae*, a NA foi proposto como uma peça-chave para o sequestro no vacúolo na desintoxicação do acúmulo de Fe na planta (revisado por NOZOYE et al., 2019). O transporte do Fe pode ser realizado também através do transportador NRAMP (*Natural resistance-associated macrophage protein*) (revisado por SANTOS et al., 2017; revisado por VIANA et al., 2022).



**Figura 2.** Estratégia combinada I e II usados em algumas gramíneas.

**Fonte:** adaptada de KOK et al., 2018.

## 2.6 Problemas de saúde por deficiência de Fe

Uma refeição rica em carboidratos, incluindo arroz, trigo e milho que são alimentos básicos, fontes de energia, podem combater a fome, mas há um problema mais profundo, chamado de “fome oculta”, que só pode ser evitada quando a dieta é rica em nutrientes. Ter uma dieta equilibrada é considerado o principal objetivo para muitas populações menos favorecidas em muitas partes do mundo. A “fome oculta” é causada pela limitação de ingestão de micronutrientes essenciais, e se mantém oculto ou despercebido até quando é diagnosticado o sintoma de deficiência nutricional (ANTONY et al., 2022; MAJUMER et al., 2019). Além dos indivíduos apresentarem carências nutricionais e alimentação restrita, promove o comprometimento na saúde e qualidade de vida, acrescentando o aparecimento de inúmeras enfermidades relacionadas à alimentação precária (VILAS BOAS, 2016).

A “fome oculta” é um problema mundial que acomete cerca de dois bilhões de pessoas e dentre elas mais de 24.000 pessoas morrem diariamente (FIAZ et al., 2019; revisado por RAHIM et al., 2022). Cerca de 30% a 40% dos dois bilhões

de pessoas apresentam anemias por deficiência de ferro (IDA - *Iron Deficiency Anemia*) (GBD 2015 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators, 2016; revisado por LUDWIG; SLAMET-LOEDIN, 2019). Os países em desenvolvimento, especialmente nos continentes da Ásia de a África, são os mais atingidos pela IDA, que é considerado um problema grave de saúde pública, prevalecendo em mulheres e crianças (MORETTI et al., 2006; VISSER e HERSELMAN, 2013). A IDA pode causar prejuízos no desenvolvimento cognitivo e físico, deficiência do sistema imunológico e elevar o risco de mortalidade materna e pré-natal (revisado por LUDWIG; SLAMET-LOEDIN, 2019; ABU-BAKER et al., 2021; KUMAR et al., 2022).

No caso do arroz, embora a concentração de Fe no solo seja alta, sendo capaz de provocar estresse pelo excesso de Fe nas plantas, a probabilidade de se acumular no grão é baixa (SANTOS et al., 2017). Ainda, o acúmulo de Fe no grão é concentrado principalmente nas camadas mais externas, que por sua vez, são perdidas no beneficiamento (DOESTHALE et al., 1979; MARQUES et al., 2021; SPEROTTO et al., 2012a). Além disso, o Fe pode se tornar indisponível, para a absorção, devido à formação de um complexo com a presença do ácido fítico (KUMAR et al., 2023; LOMBI et al., 2009; PROM-U-THAI et al., 2008; SHAHID et al., 2014; SPEROTTO et al., 2012a).

O consumo diário de nutrientes é fundamental para uma a saúde dos seres humanos, sendo necessária a ingestão de 8 a 18mg dia<sup>-1</sup> de Fe, dependendo da idade, do gênero e do peso de cada consumidor. Para o gênero masculino a ingestão indicada é de 7 mg dia<sup>-1</sup> e para o gênero feminino é recomendada 11 mg dia<sup>-1</sup>. Todavia, se a mulher estiver no período de gestação sugere-se o consumo de aproximadamente de 30 mg dia<sup>-1</sup> (VASCONCELOS; GRUISSEM; BHULLAR, 2017; YADAV et al., 2017; ARTYM et al., 2021). Grãos de arroz polidos apresentam em média 2 mg Kg<sup>-1</sup> a 11 mg Kg<sup>-1</sup> do elemento Fe (LAENOI et al., 2015; TRIJATMIKO et al., 2016). Com isso, a contribuição do arroz é ineficiente para suprir a ingestão necessária de Fe na dieta humana, levando ao surgimento de IDA, como mencionado anteriormente (SANTOS et al., 2017).

A biofortificação de cereais (com maior acúmulo de Fe no grão) é uma opção para amenizar esse problema de deficiência de Fe (revisado por

DHALIWAL et al., 2022). E o arroz é um forte candidato para biofortificação, pois além de ser cultivado em solos com alta concentração de Fe é um dos componentes da cesta básica, sendo consumido na maioria dos países. Além disso, essa espécie teve seu genoma sequenciado há bastante tempo, possibilitando a realização de inúmeros estudos moleculares quanto as estratégias de absorção de Fe e os mecanismos de alocação desse elemento (BECKER; ASCH, 2005; MASUDA et al., 2012; SWAMY et al., 2021; VASCONCELOS; GRUISSEM; BHULLAR, 2017).

## **2.7. A técnica de biofortificação para elevar teores de Fe no grão**

As estratégias para combater a deficiência de Fe incluem a fortificação, através do processamento de alimentos; a biofortificação agrônômica e biofortificação genética (JIANG et al., 2021). A biofortificação genética é uma técnica inovadora no cultivo agrícola, que tem como objetivo desenvolver genótipos com maiores teores de nutrientes. Também é considerada uma alternativa economicamente viável e eficaz em amenizar patologias associadas a carência de nutrientes. A biofortificação genética é realizada por meio do melhoramento genético vegetal e com o uso das técnicas de biotecnologia (BOUIS; SALTZMAN, 2017; DUEÑAS et al., 2021; KUMAR et al., 2019; REIS et al., 2013).

### **2.7.1 Fortificação por processamento de alimentos**

A fortificação por adição de suplementos de Fe nas farinhas de arroz é conhecida com uma estratégia bastante efetiva para combater a desnutrição por micronutrientes (HETTIARACHCHI, et al., 2004; OHANENYE et al., 2021).

Os compostos que podem ser adicionados de acordo com a recomendação para a fortificação de cereais pela OMS (Organização Mundial de Saúde) são sulfato ferroso, fumarato ferroso, pirofosfato férrico e pó de ferro

eletrolítico (WHO, 2006; revisado por HURRELL, 2022). Porém outros compostos de pó de ferro de baixo custo são utilizados para fortificar muitos cereais, no qual não estão nas recomendações da OMS, e além disso apresentam baixa disponibilidade de Fe (HURRELL et al., 2010; QUINTAES et al., 2017). Já nas regras do Brasil, conforme a Agência Nacional da Vigilância Sanitária (ANVISA), só é permitido utilizar compostos de sulfato ferroso e fumarato ferroso, assim como as suas respectivas formas em cápsulas (LOUREIRO et al., 2018). A escolha para o suplemento de Fe mais adequado para o processo de fortificação dos alimentos é um ponto chave, que em algumas situações é necessário ajustar o pH e/ou o acrescentar ligantes apropriados para assegurar a solubilidade do Fe, e por conseguinte a sua biodisponibilidade (QUINTAES et al., 2017).

Foi feita uma pesquisa pelo Ministério da Saúde, desenvolvendo o Estudo Nacional de Fortificação da Alimentação Complementar (ENFAC) entre os anos 2012 e 2013, que teve como objetivo analisar o quanto os sachês de micronutrientes em pó são eficientes quando adicionados nas merendas infantis, em conjunto com a atuação de atenção básica à saúde e as instruções sobre as práticas saudáveis. Referente ao boletim, foi visto que 50% dos casos de anemias eram referentes a carência de Fe. No estudo os resultados revelaram que a prevalência de anemia foi de 38% menor nas crianças que consumiram os alimentos fortificados. Para o grupo que apresenta a deficiência de ferro, a incidência de anemia foi 20% menor no grupo que utilizou sachês comparado ao grupo controle (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

Os programas de fortificação e biofortificação são apoiadas por organizações não-governamentais (ONGs) e organizações sem fins lucrativos, por intervenções direta de saúde pública resultando em uma redução drástica da desnutrição em todo o mundo (MASUDA et al., 2020; MONROY-GOMEZ, et al., 2022).

Porém existe uma necessidade de contribuições financeiras constante para a geração e distribuição desses suplementos ou os alimentos fortificados, podendo ser muitas vezes uma barreira prática devido os aspectos políticos, promovendo programas de biofortificação mal sucedidos (UAUY et al., 2002). E também torna-se uma opção inviável para o acesso e consumo desses alimentos

para os indivíduos que habitam em áreas rurais remotas (CHADARE et al., 2019; KIRAN, et al., 2022; MAYER et al. 2008). Além disso, a fortificação de alimentos por Fe vem a ser uma tarefa difícil, devido promover alteração na cor, sabor inaceitável, e conseqüentemente, baixa aceitação do consumidor, principalmente quando se utiliza sulfato ferroso que é mais solúvel e absorvível. Porém, em humanos também não é facilmente absorvível, a menos que seja utilizado o composto solúvel de pirofosfato de ferro (HURRELL 2002; HURRELL, 2022; MASUDA et al., 2020; SINGH et al. 2017a).

### **2.7.2 Estratégia de biofortificação agrônômica**

A biofortificação utilizando práticas agrônômicas resulta na captação de micronutrientes no solo circundante e translocação direta para as partes comestíveis das plantas. Os fatores como composição do solo, aeração, pH e umidade são relevantes para a melhor absorção e biodisponibilidade do elemento ferro para as plantas (DE VALENÇA et al., 2017; PRASAD et al., 2014; SHAHANE; SHIVAY, 2022). Por meio de práticas de manejo, as propriedades do solo podem ser modificadas para elevar a absorção e disponibilidade do Fe, como o uso de resíduos vegetais e esterco animal (HAYNES et al., 1998; PRASAD et al., 2014). O uso de resíduos orgânicos, além de apresentar essa função, também está envolvido na capacidade de troca de cátions e da retenção de água, possibilitando uma liberação contínua e mais lenta dos nutrientes (DE VALENÇA et al., 2017; ZINGORE et al., 2008). Porém a aplicação apenas de resíduos orgânicos é incapaz para mitigar a carência de Fe e é necessária uma aplicação combinada com o fertilizante contendo esse elemento (DE VALENÇA et al., 2017; revisado por KOK et al., 2018).

A utilização de fertilizantes contendo Fe, com aplicação no solo ou foliar pode aumentar o conteúdo desse elemento nos grãos de cereais (CAKMAK; KUTMAN, 2017; SOLTANI et al., 2022). Quando comparado com os fertilizantes do solo, a aplicação foliar, apresenta um progresso na captação de ferro e uma translocação mais eficiente para a cultura do arroz (VELU et al., 2014; WEI et al., 2012; YUAN et al., 2013). Porém, são influenciados por fatores endógenos

(anatomia da folha), exógenos (pH, solo) e ambientais. Posterior a aplicação foliar de Fe, as plantas levam um período de 10 a 20 dias para absorver 50% do elemento (ALSHALL e EL-RAMADY, 2017). Entretanto, os fertilizantes são geralmente perdidos após a chuva, havendo a necessidade de reaplicação, o que se torna inviável economicamente, além de promover impacto ambiental (DE VALENÇA et al., 2017; GARCÍA-BAÑUELOS et al., 2014). Por outro lado, a aplicação feita no solo é menos eficiente devida à forte ligação entre o Fe e o solo, que conseqüentemente, reduz a sua disponibilidade para a absorção pelas plantas (DE VALENÇA et al., 2017; LUDWIG; SLAMET-LOEDIN, 2019; PETRY et al., 2015).

No entanto, a aplicação de fertilizantes no solo além de ser fácil e econômica (GARG et al., 2018; YOUNDAS et al., 2022), é uma opção para curto prazo, sendo importante para a complementação da biofortificação genética, especialmente quando a região de cultivo apresenta limitações na disponibilidade de micronutrientes (CAKMAK; KUTMAN, 2017). Estudos demonstraram que houve correlação positiva entre uma maior concentração de ferro e zinco no grão de arroz com o uso de fertilizantes nitrogenados, fósforo e potássio (NPK) (BINDRABAN et al., 2015; PRASAD et al., 2014; SPEROTTO et al., 2012b; VELU et al., 2014). Tem sido demonstrado que a presença do nitrogênio eleva o teor de Fe no arroz integral numa proporção de 15%, e a incorporação de potássio possibilita aumentar ainda mais a concentração de Fe no grão de arroz (GREGORIO et al., 2000). Esse acúmulo acontece devido o nitrogênio e fósforo participarem no desenvolvimento das raízes e no transporte e realocação de Fe, no qual promove o aperfeiçoamento da translocação desse elemento para os grãos de arroz (DE VALENÇA et al., 2017; GARCÍA-BAÑUELOS et al., 2014; PETRY et al., 2015; PRASAD et al., 2014). Em contrapartida, o fósforo tem a capacidade de diminuir a toxicidade de ferro e zinco nas plantas, reduzindo a absorção desses elementos na planta através do efeito de diluição (DE VALENÇA et al., 2017). O uso da estratégia combinada de aplicação de NPK e fertilizantes de Fe é considerado uma abordagem potencial para elevar a biodisponibilidade do Fe no arroz (DE VALENÇA et al., 2017; GILL et al, 2022).

## 2.7.3 Biofortificação genética pelo melhoramento de plantas

### 2.7.3.1 Biofortificação por melhoramento convencional

O melhoramento convencional tem sido tradicionalmente utilizado há muitos séculos para melhorar as propriedades e a qualidade do grão, como moagem, cozimento e a qualidade nutricional (FITZGERALD et al., 2009; GREGORIO et al., 2000; ZHOU et al., 2022). A estratégia de seleção de genótipos com a maior presença de Fe no grão polido, e que tenha características desejáveis agronomicamente, para após serem utilizados em cruzamentos, pode ser uma alternativa promissora e eficiente para lançar cultivares com maior acúmulo de Fe nos grãos de arroz (STAFEN, 2018; ZHOU et al., 2022).

Alguns estudos mostraram que acontece uma remobilização do Fe da folha bandeira em direção ao grão. Em um determinado genótipo verificou-se que ao longo do ciclo reprodutivo da planta a concentração do Fe diminuiu na folha bandeira e houve maior acúmulo de Fe no grão. No entanto em outro genótipo foi encontrado o inverso, uma grande concentração de Fe na folha e baixa no grão. Isso mostra que esse fator de remobilização do Fe pode ser empregado no método de biofortificação, podendo ser eficaz por meio de elevar essa translocação para grão, e com isso selecionar genótipos superiores quanto a maior concentração de ferro no grão de arroz (GRIECO et al., 2022; SPEROTTO et al., 2010b; ZIELIŃSKA-DAWIDZIAK, 2015).

Há relatos de que elevar o teor de proteína no grão afeta negativamente o rendimento da cultura, por isso muitos anos foram necessários para aprimorar a qualidade nutritiva nos grãos de arroz pelo melhoramento. Porém, pesquisas atuais demonstram que uma maior concentração de Fe (e outros metais) não prejudica obrigatoriamente a produtividade (SPEROTTO et al., 2012a).

Sabe-se que variedades antigas, *landraces* e silvestres de arroz apresentam maior teor de Fe do que as variedades modernas. Assim, o *pool* gênico de espécies silvestres pode ser um excelente ponto de partida para o

processo de biofortificação, através da identificação de genes importantes e introgressão de alelos de características desejáveis, como o maior acúmulo de Fe no grão. Espécies silvestres e variedades antigas e *landraces* já foram e continuam sendo exploradas com sucesso para aperfeiçoar o arroz cultivado em características de relevância agrônômica (BRAR et al., 1997; CONNORTON; BALK, 2019; ESQUINAS-ALCÁZAR, 2005; FORNASIERO et al., 2022; SPEROTTO et al., 2012a).

Um exemplo de sucesso de biofortificação de Fe no grão por melhoramento convencional foi a variedade IR68144 (revisado por KUMARI; ROY, 2023). Além disso, essa variedade apresenta outras características desejáveis como alto rendimento, tolerância a doenças, tolerância a deficiência de minerais e excelente vigor de sementes. Desenvolvida pelo IRRI (*International Rice Research Institute*) a IR68144 foi derivada do cruzamento de IR8 (cultivar semi-anã) e Taichung (espécie nativa) (DAS et al., 2020). A IR8 é produto do cruzamento de uma variedade de Taiwan determinada “Deo - Geo - Woo - Gen” (DGWG) com uma variedade da Indonésia de elevado rendimento chamada “Peta” (PENG et al., 1999). E o Taichung é oriundo de um cruzamento do DGWG com uma variedade tradicional, com estatura elevada e com alto rendimento conhecida como “Tsai - Yuan - Chung”, que produz progênie anãs. A IR68144 é caracterizada por ser semi-anã e com propriedade de alto rendimento, apresentando  $21 \mu\text{g g}^{-1}$  de ferro em grão do tipo integral (GREGORIO et al., 2000; VIRMANI et al., 2008), retendo aproximadamente 80% da concentração de ferro após do polimento, se comparada com as outras variedades (SPEROTTO et al., 2012a). Além disso, o consumo da variedade IR68144, confirmado em testes feitos em mulheres das Filipinas (não anêmicas), obteve melhorias nos status em termos de saúde relacionados a demanda de ferro (HASS et al., 2005; KOK et al., 2018; revisado por KUMARI; ROY, 2023; MAJUMDER et al., 2019; SPEROTTO et al., 2012a).

Embora o melhoramento convencional tenha contribuído muito para o desenvolvimento de cultivares semi-anãs e com alto rendimento, para o processo de biofortificação acaba sendo insuficiente quando aplicada sozinha sem o uso de outras abordagens (GRAHAM et al, 1999). Isso acontece devido à necessidade de fazer extensos e inúmeros cruzamentos para encontrar

genótipos ideais, em virtude de as seleções para essas características serem realizadas com base nos fenótipos, e existindo possibilidade de herdar caracteres indesejáveis dos genitores (BHULLAR et al., 2013). Portanto o melhoramento convencional é melhor aproveitado com a associação de outras abordagens, dentre elas, a engenharia genética e biologia molecular para elevar o teor de ferro no grão de arroz (JENG et al., 2012; VELU et al., 2014; VIRMANI et al., 2008; WELCH et al., 2004).

### **2.7.3.2 Biofortificação com auxílio de ferramentas biotecnológicas**

#### **2.7.3.2.1 Mapeamento de QTLs**

A utilização de técnicas de biologia molecular na biofortificação por Fe é uma estratégia eficaz para o estudo de relação fenótipo - genótipo quando comparado com o melhoramento convencional de plantas (MAJUMDER et al., 2019). Com isso, a compreensão aprofundada dos mecanismos que controlam a captação de micronutrientes e a descoberta dos efeitos significativos dos locos de características quantitativas (*Quantitative Trait Loci* – QTL) para o conteúdo de Fe no grão, podem auxiliar na obtenção de arroz biofortificado. Essas informações podem ser utilizadas como base para a seleção assistida por marcadores, uma ferramenta potencial para auxiliar o melhoramento (ZHANG et al., 2014; revisado por KOÇ; KARAYIĞIT, 2022).

Nas últimas duas décadas mais de 93 QTLs foram detectados e mapeados nos 12 cromossomos de arroz para o conteúdo de Fe nos grãos (SWAMY et al., 2021). Foram mapeados a partir de distintos cruzamentos intraespecíficos e interespecíficos para formar populações de mapeamento (Tabela 1).

Um dos estudos encontrou três locos nos cromossomos 7, 8 e 9 do arroz, responsáveis por aproximadamente 19% a 30% da variação na concentração de Fe nos grãos (GREGORIO et al., 2000). Em outro estudo, foi avaliado uma população de duplo haplóides através do cruzamento IR64 x Azucena e foram

identificados dois QTLs principais para a concentração de Fe no grão, localizados nos cromossomos 2 e 12, explicando 16,5% e 13,8% da variação fenotípica, respectivamente (STANGOULIN et al., 2007). Em uma população F6 derivada do cruzamento das cultivares Bala (*indica*) x Azucena (*japonica*) foram identificados quatro QTLs relacionados a maior acúmulo de Fe no grão, sendo eles *qFe1*, *qFe3*, *qFe4* e *qFe7*, situados nos cromossomos 1, 3, 4 e 7, e responsáveis por 16,2%, 21,4%, 9,7% e 15,5% da variação, respectivamente (NORTON et al., 2010). Em estudo similar, utilizando população F6 proveniente do cruzamento Madhukar x Swarna foi encontrado sete QTLs associados ao teor de Fe nos grãos, determinados como *qFe1.1*, *qFe1.2*, *qFe5.1*, *qFe7.1*, *qFe7.2*, *qFe12.1* e *qFe12.2*, localizados nos cromossomos 1, 5, 7 e 12 (ANURDHA et al., 2012). Os possíveis genes candidatos referentes a esses QTLs são denominados como *OsYSL1* situados dentro do *qFe1.2*, *OsMTP1* localizado dentro do *qFe5.1*, *OsNas3* situados no *qFe7.1* e *qFe7.2*, *OsNRAMP1* localizado dentro do *qFe7.2* e *OsZIP8* situada aproximadamente 0,3Mb à direita do *qFe12.1*, e foi visto que a maior variação fenotípica (71%) foi referente ao QTL localizado no cromossomo 12 (ANURADHA et al., 2012; revisado por SANTOS et al., 2017).

Analisando uma população oriunda do cruzamento das cultivares Chunjiang 06 (*japonica*) x TN1 (*indica*), Du et al. (2013) identificaram três QTLs associados com a concentração de Fe no grão, situados nos cromossomos 1, 6 e 8, responsáveis por uma variação fenotípica de 15,7%, 10,6% e 22,3%. Em outro estudo, Zhang et al. (2014) detectaram um QTL localizado no cromossomo 8 associado a concentração de Fe, a partir da análise em uma população derivada do cruzamento entre Lemont (*japonica*) x Te Qing (*indica*). Ao analisar uma população F2, oriunda do cruzamento PAU21 x Palmar 579, duas variedades *indica*, Kumar et al., (2014) encontraram oito QTLs localizados nos cromossomos 2, 3, 7, 10 e 12, associados com acúmulo de Fe e Zn em grãos.

Uma coleção do Centro Nacional de Pesquisa de Arroz Dale Bumpers do USDA ARS - EUA, composto por 221 acessos de *O. sativa*, cinco acessos de *O. glaberrima*, dois acessos de *O. rufipogon* Griff. e um acesso de *O. nivara* foi utilizado para encontrar QTLs associados ao conteúdo de minerais no grão (NAWAZ et al., 2015). Neste estudo foram identificadas 11 sequências

genômicas envolvidas nos processos de ligação e transporte do Fe, determinados pelos genes *OsZIP1*, *OsHMA4*, *OsACA2*, *OsZIP2*, *OsCNGC*, *OsZIP3*, *OsZIP5*, *OsZIP9*, *OsHma2*, transportador *Abc*, *OsNAS3*, transportador de metais pesados, dedo de zinco *Chy* e *OsACA9*.

**Tabela 1.** Lista de QTLs detectados para a maior concentração de Fe no grão com o potencial para a biofortificação (SWAMY et al., 2021).

<b>Cruzamento</b>	<b>tipo e tamanho da população</b>	<b>Nº total de QTLs</b>	<b>Cromossomos</b>	<b>Referências</b>
IR64 ( <i>indica</i> ) x Azucena ( <i>japonica</i> )	linhagens DH (129)	3	2,8,12	STANGOULIS et al., 2007
Zhengshan 97 ( <i>indica</i> ) x Minghui 63 ( <i>indica</i> )	RILs (241)	2	1,9	LU et al., 2008
Teqing ( <i>O. sativa</i> sub. <i>indica</i> ) x <i>O. rufipogon</i> Griff.	ILs (85)	1	2	GARCIA-OLIVEIRA et al., 2009
Bala ( <i>indica</i> ) x Azucena ( <i>indica</i> )	RILs (79)	4	1, 3, 4, 7	NORTON et al., 2010
Madhukar ( <i>indica</i> ) x Swarna ( <i>indica</i> )	RILs (168)	7	1, 5, 7, 12	ANURADHA et al., 2012
Swarna ( <i>indica</i> ) x Madhukar ( <i>indica</i> )	F2 (178)	3	3, 4	NAGESH et al., 2013
PAU201 ( <i>indica</i> ) x Palman 579 ( <i>indica</i> )	F2 (247)	8	2, 3, 7, 10, 12	KUMAR et al., 2014
Ce258 ( <i>indica</i> ) x IR75862 ( <i>japonica</i> ) & ZGX1 ( <i>indica</i> ) x IR75862 ( <i>japonica</i> )	BILs (201)	2	6,11	XU et al., 2015
Swarna ( <i>indica</i> ) X Moroberekan ( <i>japonica</i> )	RILs (60)	1	1	INDURKAR et al., 2015
XB ( <i>O. sativa</i> ) x acesso DWR ( <i>O. rufipogon</i> )	BILs (202)	3	3, 6, 9	HU et al., 2016
População de inter cruzamentos de geração avançada multiparental (MAGIC)	Multiparental (144)	7	3, 7, 9, 10, 11	DESCALSOTA et al., 2018
PSBRc82 ( <i>indica</i> ) x Joryeongbyeon (arroz coreano) & PSBRc82 x IR69428 ( <i>indica</i> )	Linhas DH (97)	1	4	SWAMY et al., 2018a
Acesso de arroz pigmentado	Painel	2	6, 12	DESCALSOTA-EMPLEO et al., 2019a, b
RP-Bio 226 ( <i>indica</i> ) x Sampada ( <i>indica</i> )	BC <sub>2</sub> F <sub>5</sub> (111)	4	1, 6	DIXIT et al., 2019
PAU201 ( <i>indica</i> ) x Palman ( <i>indica</i> )	F4 Population (579)	5	5, 7, 9	KUMAR et al., 2019
IR05F102 ( <i>indica</i> ) x IR69428 ( <i>indica</i> )	DH (148)	2	9,12	CALAYUGAN et al., 2020
93-11 ( <i>indica</i> ) x Milyang 352 ( <i>japonica</i> )	DH (123)	7	3	LEE et al., 2020

Além de pesquisas visando o mapeamento de QTLs, estudos de expressão gênica também são importantes na identificação de genes envolvidos com o acúmulo de Fe no grão de arroz. Nesse contexto, um estudo desenvolvido por Sperotto et al. (2010a), verificaram correlação positiva entre os genes *OsYSL14* e *OsNAC5* e o maior teor de Fe nos grãos e uma correlação negativa com os genes *OsNRAMP7*, *OsNRAMP8* e *OsFRO1* e o acúmulo de Fe. Além disso, os genes *OsFER1*, *OsNRAMP4*, *OsNRAMP5*, *OsNRAMP6*, *OsYSL6*, *OsYSL12*, *OsYSL4*, *OsZIP8* e *OsZIP10* também apresentaram correlação com o maior acúmulo de Fe nos grãos de arroz.

A abordagem de melhoramento molecular para a biofortificação das culturas é uma alternativa sustentável e de longo prazo (SINGH et al., 2022). Possibilita o desenvolvimento de genótipos que apresentam uma produção estável, não necessitando de manejo diferenciado, sendo uma opção viável para o consumo de desnutridos e famílias com baixas condições financeiras e com acesso restrito a dietas variadas, suplementos e alimentos fortificados (HEFFERON et al., 2016; JAIN et al., 2018; JAIN et al., 2019; revisado por SHARMA et al., 2020; SWAMY et al., 2021)

#### **2.7.3.2.2 Transgenia**

Considerando todas as técnicas de melhoramento genético vegetal, a transgenia ganha destaque por ser promissora para os processos de biofortificação, por ser caracterizada como eficiente e ágil para esse fim (SANTOS et al., 2017; revisado por MEENA et al., 2022). A grande vantagem da técnica de transgenia sobre o melhoramento tradicional é que possibilita atuar diretamente com genes de interesse, modificando a expressão de genes endógenos (cisgênicos) ou pela introdução de material genético provenientes de outras espécies (transgênicos) (CONNORTON et al., 2017a). Diferentes abordagens de transgenia têm sido realizadas visando a biofortificação de Fe em arroz. Dentre as estratégias estão, melhorar o armazenamento de Fe pela ferritina, baseada

na quelação por genes *NAS*; melhorar o fluxo de Fe através de genes *OsYSL2*; aprimorar a translocação do fluxo de ferro via genes *IDS3* e pelo silenciamento dos genes *OsVIT*; manipulação de reguladores e translocação de Fe; e a busca por arroz com baixo teor de fitato pelo silenciamento de genes envolvidos na síntese de ácido fítico por RNAi; maior liberação de Fe ligado ao ácido fítico por meio dos genes que codificam fitase, a superexpressão de exportadores de quelantes de Fe e combinação de transgenes múltiplos (Figura 3) (MAJUMDER et al., 2019; VIANA et al., 2022).

A ferritina é uma proteína de armazenamento, apresenta a função de fenoxidase, e é capaz de armazenar até 4500 átomos de Fe na forma complexa não tóxica (ANDREWS et al., 1992; THEIL et al., 2003). Os primeiros estudos de ferritina foram encontrados na soja, sendo os dois tipos de ferritina codificados pelos genes *SoyferH1* e *SoyferH2* (KOK et al., 2018). Sabe-se que esse Fe na forma complexada com ferritina em soja é eficientemente absorvido pelo intestino dos seres humanos. Com essa informação, os genes de ferritina da soja foram identificados como genes candidatos para o processo de biofortificação no arroz (Figura 3) (THIEL, 2011; revisado por KASOTE et al., 2021). Em muitos estudos, os experimentos realizados com promotores dos genes globulina (*OsGlb*) e glutelina (*OsGluB1*), específicos do endosperma do arroz foram utilizados para controlar a expressão do gene que codifica a ferritina, resultando em um aumento da concentração de Fe de até 3,7 vezes o grão de arroz (GOTO et al., 1999; KHALEKUZZAMAN et al., 2006; LUCCA et al., 2002; revisado por MAJUMDER et al., 2019; OLIVA et al., 2014; PAUL et al., 2012; QU et al., 2005; VASCONCELOS et al., 2003).

As plantas de arroz absorvem uma determinada concentração de Fe, porém, a sua translocação é restrita para o endosperma. É possível a existência de um rigoroso sistema que atua na translocação do Fe localizado no endosperma do arroz. Com isso, o Fe permanece nas camadas mais externas do grão, explicando a baixa concentração de Fe após o polimento (MASUDA et al., 2013b; revisado por VIANA et al., 2022). Dessa forma, o entendimento do mecanismo de translocação pode ser utilizado em abordagens para internalização do Fe no grão de arroz.

A estratégia baseada na quelação por proteínas codificadas por genes *NAS* através da superexpressão desses, pode desenvolver um arroz enriquecido com Fe, sendo uma estratégia considerada promissora para muitos cientistas (Figura 3). Esses genes estão envolvidos na síntese do MA, no qual apresentam a função de captação de Fe no solo quando a planta está sofrendo por deficiência desse mineral (MAJUMDER et al., 2019). A superexpressão dos genes *NAS*, *OsNAS1* (JOHNSON et al., 2011), *OsNAS2* (LEE et al., 2012) e *OsNAS3* (LEE et al., 2009b) utilizando promotores do vírus do mosaico de couve-flor 35S e da *ZnUBIQUITIN*, resultou em maior acúmulo de Fe em mais de duas vezes nos grãos polidos na cultivar Tsukinohikari, da subespécie *japonica* (CONNORTON et al., 2019; KOK et al., 2018; revisado por DEY et al., 2023). Proteínas codificadas por esses três genes *NAS* participam do transporte de metais divalentes a longas distâncias, sendo que cada um deles é regulado em distintas partes das plantas devido à resposta à deficiência de Fe (INOUE et al., 2003; SINGH et al., 2017b). Além disso, houve um aumento de 1,4 vezes no acúmulo de Fe em grão polidos do arroz Tsukinohikari quando foi feita a superexpressão da dioxigenase (*IDS3*) (MASUDA et al., 2008; revisado por KASOTE et al., 2021). Por fim, quando o gene *HvNAS1* derivado da cevada foi introduzido no arroz foi detectado um teor de Fe dobrado em grãos polidos (MASUDA et al., 2009; revisado por KASOTE et al., 2021).

Uma das possibilidades para elevar o transporte de Fe do floema para as sementes em desenvolvimento é a superexpressão dos genes *YSL* (Figura 3). Proteínas *YSL* desempenham uma função fundamental como transportadores de quelantes de metais (Fe), envolvidos na translocação e acúmulo de Fe no endosperma (ISHUMARU et al., 2010; KOIKE et al., 2004; revisado por PANDIT et al., 2021). Todos os genes participam do transporte a grandes distâncias do complexo  $Fe^{3+}$ -MA via floema, sendo o *OsYSL2* um dos principais (KOIKE et al., 2004; revisado por PANDIT et al., 2021; SCHROEDER et al., 2013). Foi verificado que a expressão do gene *OsYSL2* ocorre apenas em folhas de plantas que apresentam deficiência em Fe, não sendo detectado a expressão em nenhuma das outras partes da planta (KOIKE et al., 2004; revisado por PANDIT et al., 2021). Estudos demonstraram que o silenciamento do gene *OsYSL2*

provocou uma redução do teor de Fe de 18% no arroz integral e 39% no arroz polido quando comparado com as plantas selvagens.

Sabe-se que o transportador de sacarose (*OsSUT1*) é intensamente expresso em células companheiras de floema e sementes imaturas, demonstrando evidências que a expressão específica do tecido é essencial para deslocar mais Fe no endosperma do grão (SCOFIELD et al., 2007; AOKI et al., 2003; CONNORTON et al., 2019). Quando foi realizado a superexpressão do gene *OsYSL2* inserido num promotor de *OsSUT1* no arroz, houve um acréscimo de quatro vezes mais na concentração de Fe em grãos polidos utilizando a cultivar *japonica* Tsukinohikari (ISHUMARU et al., 2010). Sendo assim, o gene *OsYSL2* com o promotor *OsSUT1* é uma abordagem promissora para elevar o teor de Fe nos grãos de arroz (MASUDA et al., 2013a; KOK et al., 2018; revisado por PANDIT et al., 2021).

A estratégia para melhorar a captação e translocação do Fe tem o intuito de introduzir no arroz distintos tipos de genes que codificam enzimas envolvidas na síntese de MAs, oriundos de diferentes fontes vegetais (MAJUMDER et al., 2019). Sabe-se que os MAs são determinados como quelantes naturais de Fe, e participam no transporte do Fe da rizosfera para a planta, formando o complexo com o Fe (KOK et al., 2018). Os genes envolvidos na síntese de MAs foram identificados em cevada (BASHIR et al., 2006; MASUDA et al., 2013a). Em condição de deficiência de Fe ocorre a ativação dos genes *IDS2* e *IDS3* na cevada, promovendo uma função fundamental para o combate a essa condição (BASHIR et al., 2006; NAKANISHI et al., 2000; MASUDA et al., 2013a; revisado por PANDIT et al., 2021). Os genes *IDS* tem a capacidade de sintetizar distintos tipos de MAs por meio de DMA, e esses genes são fortemente expressos nas raízes como resposta ao estresse causado pela deficiência de Fe. Em contrapartida o arroz não consegue sintetizar alguns tipos de MAs como ácido 3-epi-hidroximuginêico (epi-HMA) e ácido 3-epi-hidroxi-20-desoximuginêico (epi-HDMA), somente o DMA, devido não conter os genes *IDS2* e *IDS3*, e indicando que a cevada é considerada mais tolerante a condições de deficiência de Fe (KOBAYASHI et al., 2001; revisado por PANDIT et al., 2021).

A introdução do gene *IDS3* derivado da cevada em plantas de arroz possibilitou a síntese e a secreção de diferentes tipos de MAs na rizosfera. Além

do mais, o complexo  $\text{Fe}^{3+}$ - MA é mais estável quando comparado com o complexo  $\text{Fe}^{3+}$ - DMA no solo ligeiramente ácido. Com isso, a expressão dos genes *IDS* é capaz de auxiliar no acréscimo de captação de Fe no solo e a translocação do mesmo nos tecidos das plantas de arroz (Figura 3) (VON-WIREN et al., 2000; revisado por PANDIT et al., 2021).

A introdução do gene *IDS3* em genótipos de arroz resultaram em um aumento no acúmulo de Fe em 1,4 e 1,3 vezes nos grãos polidos e grãos integral, respectivamente, em comparação o arroz controle, independente do teor de Fe do solo (MASUDA et al., 2008; SUZUKI et al., 2008; PANDIT et al., 2021). Com as informações e disponibilidade de dados dos sequenciamentos dos genomas das gramíneas que vem surgindo ao longo do tempo, diferentes tipos de genes de *IDS* serão identificados e poderão contribuir para a biofortificação de Fe na pesquisa de arroz (MAJUMDER et al., 2019).

Uma outra abordagem de aprimorar o fluxo e a translocação do Fe é através dos genes *VITs*, que codificam transportadores que desempenham um papel relevante no transporte de metais para toda a planta, inclusive para os grãos (Figura 3) (MAJUMDER et al., 2019). A caracterização funcional dos genes que codificam transportadores de Fe vacuolar no arroz (*OsVIT1* e *OsVIT2*) demonstram que essas proteínas atuam especificamente no transporte de  $\text{Zn}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{2+}$  para o vacúolo por meio do tonoplasto (KIM et al., 2006; ZHANG et al., 2012; PANDIT et al., 2021). Foi visto que a expressão dos genes *VIT* é considerada onipresente, ou seja, em toda a planta de arroz e com baixa expressão, porém foi detectado maior expressão na folha bandeira (ZHANG et al., 2012).

O silenciamento dos genes *VIT* no arroz eleva significativamente o teor de Fe e Zn nos grãos e, conseqüentemente, diminui o teor de Fe e Zn nas folhas bandeira (Figura 3) (BASHIR et al., 2013a). O silenciamento dos genes *OsVIT1* e *OsVIT2* no arroz provocou um acréscimo na concentração de Fe no grão de 1,4 vezes (BASHIR et al., 2013a; ZHANG et al., 2012; PANDIT et al., 2021). Contudo, essa abordagem pode ser prejudicial para cultura se o solo estiver poluído, uma vez que foi detectado um acúmulo da concentração de Cádmio ( $\text{Cd}^{2+}$ ) nos grãos de arroz quando foi cultivado no solo contaminado com metais pesados (ZHANG et al., 2012). Portanto, há necessidade de elucidar os

mecanismos regulatórios, especialmente o domínio de ligação do  $Cd^{2+}$ , para impedir o acúmulo de metais tóxicos no arroz biofortificado e certificar que a cultura esteja segura para o consumo (revisado por KOK et al., 2018; revisado por MAJUMDER et al., 2019; PANDIT et al., 2021).

A manipulação de reguladores negativos das respostas à insuficiência de Fe em arroz, denominados de *OsHRZ1* e *OsHRZ2*, que codificam proteínas com atividade de ubiquitina ligase, pode ser uma alternativa para elevar o teor de Fe no grão (Figura 3). O gene *OsHRZ* designa *Haemerythrin motif-containing Really Interesting New Gene* (RING) e *Zinc-finger protein*, e codificam proteínas que ligam-se ao Fe e Zn e contêm uma atuação de ubiquitinação (KOBAYACHI et al., 2013; revisado VIANA et al., 2022). Quando o gene *OsHRZ2* é silenciado por meio de RNAi no arroz (*RNAi-HRZ2*) houve um maior acúmulo de Fe na parte aérea e nas sementes, quando comparado com as plantas que não tiveram o silenciamento de *OsHRZ2*. As plantas transgênicas *RNAi-HRZ2* possuíram entorno de 3,8 vezes e 2,9 vezes mais Fe nos grãos no arroz integral e branco polido, respectivamente (MASUDA et al., 2019).

Quando a planta está submetida ao estresse de deficiência de Fe promove a ativação dos fatores de transcrição *bHLH*, especialmente o *OsIRO2* que possui a função de regulador positivo dos principais genes envolvidos no processo de absorção de Fe associado ao MA (Figura 3) (OGO et al., 2006). A superexpressão do *OsIRO2*, introduzido no promotor *CaMV35S*, demonstrou um aumento de duas a três vezes na quantidade de Fe nos grãos de arroz integral e polido, respectivamente, comparado com o arroz controle (revisado por VIANA et al., 2022). Além disso, a superexpressão de *OsIRO2* resultou em uma elevada concentração de Fe nos grãos mesmo quando o cultivo foi realizado em solos com calcário e também mostrou um maior teor de Zn nos grãos (OGO et al., 2007; OGO et al., 2011). Essa estratégia de biofortificação de Fe em arroz tem a capacidade de ser mais eficiente quando o arroz for cultivado em solos com calcário (revisado por MAJUMDER et al., 2019).

O ácido fítico está presente em cerca de 80% da camada de aleurona nos grãos da grande maioria dos cereais, exceto o milho. O ácido fítico se aglomera como sais mistos, formando o fitato, que contém íons negativos, tornando-se um potente quelante de cátions divalentes como  $Fe^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  e  $Mg^{2+}$ , no qual

diminui a biodisponibilidade desses minerais divalentes essenciais (revisado por VIANA et al., 2022). É necessário que tenha uma proporção molar de <1:1 de ácido fítico para Fe, para aprimorar significativamente a absorção de Fe nas dietas humanas a base de cereais (HURRELL; EGLI, 2010). Inúmeras tentativas para a redução do ácido fítico no arroz foram realizadas, desenvolvendo variedades mutantes com um fenótipo com baixa concentração de ácido fítico (*low fitic acid - lfa*) (KIM et al., 2008; LARSON et al., 2000). Porém essas linhagens limitam o rendimento da colheita e a performance geral da planta. Uma das alternativas para reduzir os efeitos do ácido fítico seria direcionar o Fe especificamente para o endosperma (CONNORTON et al., 2017b). Outra estratégia seria a manipulação da biossíntese do ácido fítico através do RNA de interferência (*RNAi*), silenciando as enzimas chaves envolvidas na sua síntese (ALI et al., 2010; KARMAKAR et al., 2020; KUWANO et al., 2009).

A enzima mio-inositol-3 fosfato sintase (*MIPS*) atua na primeira etapa da biossíntese de ácido fítico em sementes de arroz. Genes *MIPS* foram silenciados sob o controle dos promotores da *Gluteína B1 (GluB1)* e *Oleosina 18 (Ole18)* (específicos de sementes) e *CaMV35S* (constitutivo) (FENG; YOSHIDA, 2004; ALI et al. 2013a; KUMANO et al., 2006; KUWANO et al., 2009; revisado por VIANA et al., 2022). Posterior a ocorrência do silenciamento do *MIPS*, as sementes de arroz demonstraram modificações no nível de mio-inositol. Quando o silenciamento for feito nos genes que codificam as enzimas que atuam na etapa posterior a biossíntese do ácido fítico de arroz, é preciso cuidado para diminuir o teor de fitato nas sementes sem causar prejuízos nas vias relevantes associadas (Figura 3) (MAJUMDER et al., 2019).

Uma cultivar da subespécie *indica* chamada de Pusa Sugandhi II (PSII) foi submetida a manipulação da expressão de um gene que codifica a enzima inositol-1,3,4,5,6- pentacisfosfato 2 quinase (*IPK1*), que atua na etapa final do metabolismo do ácido fítico. Foi realizado o silenciamento do gene *IPK1* utilizando o promotor específico de semente *Ole18*, por meio da tecnologia *RNAi* (revisado por VIANA et a., 2022). Houve uma regulação negativa de 3,85 vezes dos transcritos de *IPK1*, que apresentam uma correlação positiva com os níveis de fitato, ou seja, promovendo uma diminuição da concentração. Em contraste, houve um acréscimo de fosfato inorgânico (*Pi*) e obtiveram um acúmulo de 1,8

vezes mais de Fe no endosperma sem afetar o desenvolvimento e crescimento das plantas de arroz transgênicas (ALI et al., 2013b).

Quando realizado o silenciamento do gene que codifica inositol trifosfato-quinase (ITPK), denominado (*OsITP/6K-1*), na variedade de arroz *indica* Khitish, através da *RNAi*, utilizando promotor específico para sementes, observou-se uma redução de 46,2% do ácido fítico. Com isso, foi identificado um acúmulo de 1,3 vezes mais de Fe, 1,6 vezes mais de Zn e uma biodisponibilidade maior de 3,2 vezes de Pi (KARMAKAR et al., 2020; revisado por VIANA et al., 2022). Um estudo utilizou a técnica de silenciamento de genes envolvidos na síntese do ácido fítico mediado por *RNAi* e a superexpressão do gene codificador da ferritina em plantas de arroz, visando a biofortificação com Fe. As plantas transgênicas foram cultivadas por várias gerações até obter a homozigose e não demonstraram modificações na estrutura e morfologia das sementes de arroz e apresentaram alta concentração de Fe (revisado por MAJUMDER et al., 2019).

Outra opção para diminuir a concentração do ácido fítico é a utilização das enzimas fitases, que se expressam no fungo *Aspergillus fumigatus*, demonstrando ser uma estratégia promissora na biofortificação no arroz (Figura 3). A fitase é capaz de catalisar a hidrólise do ácido fítico (fitato) promovendo a liberação dos minerais que estão quelados ( $Fe^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  e  $Mg^{2+}$ ), inclusive o fosfato, e possibilitando um aumento da biodisponibilidade mineral (WELCH et al., 2002). A fitase do fungo *A. fumigatus* (*Afphytase*) apresenta propriedade termotolerante, sendo mais propício para o processamento de alimentos e para as aplicações de biofortificação em culturas básicas (PASAMONTES et al., 1997).

Ao realizar a introdução do gene *Afphytase* no arroz, foi relatado que houve um aumento da concentração de Fe em grão polidos (BONYAVES et al., 2016; BONYAVES et al., 2017; WIRTH et al., 2009; revisado por WAIRICH et al., 2022). Ao superexpressar o gene *appA* (fitase) de *Escherichia coli* na cultivar *indica* Khitish de arroz, verificou-se maior acúmulo de Fe, Zn e Pi, em duas, três e quatro vezes mais, respectivamente (BHATTACHARYA et al., 2019). Em outro estudo, foi introduzido o gene *Afphytase* com expressão no endosperma do arroz, juntamente com gene que codifica a proteína similar à metalotioneína, rica em cisteína (para aperfeiçoar a absorção de Fe) em arroz (LUCCA et al., 2001;

revisado por WAIRICH et al., 2022). A cisteína contribui para a absorção de ferro não-heme ( $\text{Fe}^{3+}$ ) (TAYLOR et al., 1986), e cada molécula de metalotioneína (MT) é composta por uma enorme porção de cisteína (12 a 74 aminoácidos de MTs em plantas) (HSIEH et al., 1995). Por meio da superexpressão específicas de MTs no endosperma do arroz, o teor de cisteína pode ser elevada nos grãos, que induz o aumento da biodisponibilidade do Fe. No arroz transgênico desenvolvido, denominado Taipei-309, a concentração de fitase obteve um acréscimo de 130 vezes nos grãos, e quando feito um teste de simulação da digestão, resultou numa degradação completa do ácido fítico (revisado por MAJUMDER et al., 2019; revisado por WAIRICH et al., 2022).

Outra técnica de biofortificação de Fe é a exportação de quelante de Fe através da superexpressão dos genes envolvidos na síntese do ácido muginêico ou dos genes codificadores do transportador ácido protocatecuíco (Figura 3). O gene codificador de transportador conhecido como *TOM1*, apresenta a sua expressão nas regiões limitadas do exoderma das raízes em condições de Fe suficiente e deficiente no solo. Além disso, o *TOM1* também se expressa nos feixes vasculares das bainhas e floema das folhas, no pólen e no feixe vascular dorsal no desenvolvimento das sementes. Quando realizada a superexpressão do *TOM1*, houve um aumento da secreção do DMA, e conseqüentemente, elevou 1,2 vezes o teor de Fe, 1,6 o teor de Zn e a tolerância a deficiência de Fe na planta (NOYOZE et al., 2011; revisado por WAIRICH et al., 2022).

As plantas liberam compostos fenólicos para promover a absorção de Fe precipitado apoplásmatico, como o ácido protocatecuíco (PCA) (CESCO et al., 2010). Foi identificado um transportador de efluxo de compostos fenólicos no arroz, codificado pelo gene *PEZ1*, que por sua vez, tem a função de aumentar a concentração de PCA na seiva do xilema no qual é fundamental para a utilização do Fe precipitado apoplasmático localizado no cilindro central, parte determinada entre o caule a raiz. A expressão do *PEZ1* é principalmente no cilindro central nas raízes. Em um trabalho desenvolvendo linhagens de arroz transgênico, contendo a construção gênica do promotor *CaMV35S-PEZ1*, houve um acréscimo de três vezes no acúmulo de Fe nas folhas. Quando observado o teor de Fe nessas mesmas linhagens nas raízes, foi visto um aumento de Fe de duas vezes devido ao alto nível de solubilização de Fe precipitado apoplasmático no

cilindro central (ISHIMARU et al., 2011). Com isso, a superexpressão de *PEZ1* também pode resultar no aumento da concentração de Fe nas sementes (MASUDA et al., 2013a; revisado por BASHIR et al., 2022).

Por fim, um maior acúmulo de Fe nas sementes pode ser obtido através da exportação de quelato, superexpressando os genes *TOM1* e *PEZ1*, combinado com outras estratégias, como expressão do gene da ferritina, com os genes *NAS* ou com o gene *OsYSL2* utilizando o promotor *OsSUT1* (MASUDA et al., 2013a).

Mais uma estratégia de transgenia que pode ser utilizada para a biofortificação de Fe no arroz é a piramidização, ou seja, a combinação de vários genes comentados nas estratégias anteriores (Figura 3). Pela combinação e introdução dos genes *Pvferritina*, *AtNAS1* e *Atphytase*, foi obtido um arroz transgênico a partir da cultivar Taipei-309, com 6,3 vezes maior teor de Fe em grão polidos (WIRTH et al., 2009; revisado por WAIRICH et al., 2022). Uma variedade de arroz conhecida como Tsukino Hikari foi desenvolvida por meio da introdução da combinação de genes *SoyferH2*, *HvNAS1*, *OsYSL2*, que provocou um acréscimo de seis vezes na concentração de Fe nos grãos de arroz integral (MASUDA et al., 2012). Outro estudo também demonstrou um aumento de seis vezes no acúmulo de Fe nos grãos polidos do genótipo IR64 utilizando a combinação dos genes *SoyferH1* e *OsNAS2* (TRIJATMIKO et al., 2016; revisado por KASOTE et al., 2021). Quando foi feita a inserção da combinação dos genes *SoyferH2*, *HvNAS1* e *OsYSL2*, produzindo uma variedade chamada de Paw San Yin, houve um aumento de 3,4 vezes na concentração de Fe em grão polidos (AUNG et al., 2013; revisado por WAIRICH et al., 2022).

Em outro trabalho realizado na cultivar Nipponbare, observou-se um acréscimo de Fe de 4,7 vezes nos grãos polidos através da combinação dos genes *AtIRT1* (que codifica o transportador de  $Fe^{2+}$ ), *Pvferritina* e *AtNAS1* (BOONYAVES et al., 2017; revisado por DHALIWAL et al., 2022). Quando feita a introdução da combinação dos 4 genes conhecidos como *AtIRT1*, *Pvferritina*, *AtNAS1* e *Atphytase*, no genótipo de Taipei-309, houve a elevação no teor de Fe para 4,3 vezes em grãos polidos dessa variedade (BOONYAVES et al., 2016). Quando adicionados 3 genes da cevada (*HvNAS1*, *HvNAAT-A* e *HvNAAT-B*) que estão envolvidos na biossíntese de ácido muginêico, em conjunto com o gene



### 2.7.3.3.1 Mapeamento Associativo

O entendimento da base molecular de características complexas promove o auxílio da piramidização de vários genes e QTLs para desenvolver genótipos de arroz superiores para utilização pelos agricultores (DESCALSOTA et al., 2018). Os estudos de mapeamento associativo ou de associação genômica ampla (*Genome Wide Association – GWAS*) tem se demonstrado extremamente vantajoso para a identificação de regiões nos cromossomos e até alelos específicos, relacionados a alta concentração de Fe nos cereais (CONNORTON et al., 2019).

O GWAS permite identificar variantes genéticas associados a características quantitativas apresentando muitas vantagens, mas limitações também. O mapeamento associativo exige um elevado número de marcadores moleculares com alta densidade para identificar genes relacionados ao caractere de interesse (CUI et al., 2015). É necessária uma população de um tamanho relativamente grande, com repetições sob diferentes condições ambientais, para impedir o surgimento de associações espúrias (WEN et al., 2009). Além disso, a realização de GWAS depende da presença de vários eventos de recombinação genética formada ao longo de muitas gerações desses genótipos, já que utiliza população não relacionada com intuito de ter alta variabilidade genética (HAN; HUANG et al., 2013; WEN et al., 2009).

O mapeamento associativo tem maior eficiência para os estudos de caracteres quantitativos e herança complexa, obtendo uma melhor resolução, e maior número de alelos detectados quando comparado com o mapeamento de ligação (NORDBORG; TAVARÉ, 2002; revisado por PANDIT et al., 2021). Além disso, inclui toda a variabilidade genética existente nas origens dos genótipos, permite trabalhar toda a série alélica disponível em um banco de germoplasma, não havendo a obrigação de formar populações segregantes e podendo utilizar dados fenotípicos e moleculares apresentados em outros trabalhos (YU; BUCKLER, 2006). E também promove a redução de tempo da pesquisa exigida para a realização do estudo (WEN et al., 2009; revisado por PANDIT et al., 2021).

No mapeamento associativo é indispensável o uso de marcadores moleculares. Dentre eles os SNPs (nucleotídeo de polimorfismo único), o mais indicado por ser caracterizado como alta densidade e distribuição no genoma. Esses marcadores são capazes de identificar e cobrir especificamente as regiões do genoma associadas aos caracteres de interesse como acúmulo de Fe nos grãos de arroz polido (HAN; HUANG, 2013; WEI et al., 2018; YANG et al., 2014; revisado por LIU et al., 2021).

Em estudos de mapeamento associativo tem sido possível identificar QTLs para maior concentração de Fe nos grãos de arroz, e para outros vários elementos minerais (NORTON et al., 2010; ZHANG et al., 2014). Um trabalho foi feito utilizando uma população de intercruzamentos de geração avançada multiparental (MAGIC) com 144 genótipos de arroz, e foram encontrados locos associados ao maior acúmulo de Fe, incluindo genes alvos relacionados a homeostase do Fe, como o *OsNAS3* e *OsVIT1* (DESCALSOTA et al., 2018). Outros estudos de GWAS foram realizados para a identificar os locos genômicos que controlam o Fe nos grãos utilizando distintas populações de arroz (BOLLINEDI et al., 2020; CU et al., 2021; LIU et al., 2020; PRADHAN et al., 2020; TALUKDAR et al., 2021; YANG et al., 2018b; ZHANG et al., 2018; ZAW et al., 2019). Nesse sentido, a estratégia de GWAS é bastante promissora para identificar genes candidatos e QTLs significativos associados a maior concentração de Fe nos grãos de arroz.

### **2.7.3.3.2 Edição gênica**

Embora estudos com transgenia, como demonstrado anteriormente, têm sido bastante promissores para o aumento de concentração de Fe nos grãos polido no arroz, ainda ocorre uma perda significativa desse elemento quando o arroz passa pelo processo de polimento (AUNG et al., 2013). Além disso, a transgenia não é bem aceita em grande parte dos países, sendo um obstáculo para a aceitação de mercado, principalmente em países em desenvolvimento que apresentam a maior necessidade de alimentos fortificados. Neste sentido, torna-se cada vez mais necessário o uso de novas técnicas de biologia molecular

e biotecnologia para amenizar as perdas ocasionadas pelo polimento e pela não aceitação de plantas transgênicas.

Dentre as ferramentas moleculares, a edição de genomas também se torna uma alternativa para a obtenção de genótipos com maior acúmulo de Fe nos grãos, através de inserções, deleções ou substituições de nucleotídeos. A edição permite a alteração da resposta dos genes alvos e/ou segmentos de DNA, que conseqüentemente, modificam a resposta da característica de interesse que se quer obter (ZHU et al., 2017).

Existem quatro sistemas de edição de genomas, que tem a função comum de induzirem alterações específicas nos genes alvos, sendo eles Meganucleases (MN), nucleases associadas ao dedo de zinco (ZFN), efetor de ativação da transcrição associado a nuclease (TALEN) e Repetições palindrômicas curtas agrupadas e regularmente interespaçadas associadas a nuclease (CRISPR). Todos esses sistemas são mediados por diferentes nucleases que introduzem a quebra da dupla fita de DNA (DSBs), que por sua vez, podem provocar cortes simples ou duplo. O mecanismo de reparo utilizado pode ser recombinação homóloga (HR), desde que fornecido uma DNA doador, e união/junção final não homóloga (NHEJ) (BORTESI e FISCHER, 2015; revisado por ZHU et al., 2017; revisado por BHAMBHANI et al., 2021). Conforme o mecanismo de reparo utilizado, distintas alterações serão obtidas, resultando em variabilidade genética, produzida por meio da DSB realizadas pelas nucleases seguido de reparo (VIANA et al., 2019).

As meganucleases são caracterizadas como endonucleases de sítio específicos, com o papel de reconhecer e clivar sequências longas de 14 a 40 pares de base com elevada especificidade. Podem ser manipuladas por meio de técnicas para aumentar o número de sítios alvos, tornando-se uma ferramenta para a edição de genomas (ARNOULD et al., 2011; GUHA et al., 2017). MN possibilita a indução de DSBs que podem ser reparadas por HR ou NHEJ, podendo ser considerado um processo propenso a erros devido a ocorrer inserções ou exclusões no sítio de clivagem (ARNOULD et al., 2011; TRÖDER; ZEVNIK, 2022). As MNs atuam eficientemente em estudos com *Arabidopsis*, algodão e milho (revisado por WEEKS et al., 2016). Não há relatos sobre a utilização de MNs em arroz, mas os estudos com as espécies ditas

anteriormente, sugerem as MNs como sendo uma ferramenta potencial para arroz, quando o objetivo é uma mutação específica (DABOUSSI et al., 2015; ZHU et al., 2017; VIANA et al., 2019; NIZOLLI et al., 2021; NIZOLLI et al., 2023).

As nucleases associadas ao dedo de zinco (ZFN) são determinadas como enzimas de restrição formadas por uma fusão de um domínio de clivagem de DNA não específico da enzima de restrição *Fok I* com as proteínas específicas do dedo de zinco (ZFNs) ligadas a sítio específico no DNA (KIM et al., 1996; GUO et al., 2010; TRÖDER; ZEVIK, 2022). A enzima de restrição *Fok I* (*Flavobacterium okeanoicoites*) é composta por domínio N-terminal de ligação ao DNA (substituído por domínios dedo de zinco) e um domínio C-terminal que representa a atividade de clivagem ao DNA de modo não específico. Proteínas dedo de zinco são compostas por uma estrutura modular contendo motivos CH2, cada motivo reconhece 3 a 4 nucleotídeos na  $\alpha$ -hélice e quando os motivos estão em tandem são capazes de reconhecer regiões alvo (LIU et al., 1997; BEERLI e BARBAS, 2002; GUO et al., 2010). Os ZFNs são aplicados na edição de genomas por meio de indução das DSBs em sítios específicos no DNA genômico. Com isso, os genes chaves tem chances de ser interrompidos pela mutagênese ocasionada pelo reparo NHEJ ou por HR se for provido de DNA homólogo (GUO et al., 2010). O ZFN tem apresentado bons resultados e pode ser utilizado no melhoramento de arroz (CANTOS et al., 2014; JUNG et al., 2018; SHUKLA et al., 2013, revisado por TIWARI; LATA, 2019).

As proteínas efetoras de ativação da transcrição (TALE) são encontradas naturalmente nas bactérias do gênero *Xanthomonas* (revisado por NEMUDRYI et al., 2014). O TALE possui um domínio de ligação contendo monômeros com 34 aminoácidos repetidos, e cada domínio identifica um par de bases. A especificidade do TALE é determinada por dois aminoácidos hipervariáveis situados na posição 12<sup>o</sup> e 13<sup>o</sup> do monômero, e são determinados como resíduos de repetição-variável (*repeat-variable diresidues* - RVDs). Os RVDs podem ser manipulados para formar proteínas de ligação ao DNA em sítios específicos no genoma (revisado por NEMUDRYI et al., 2014). É feita a fusão da sequência codificadora TALE com o domínio de corte da endonuclease *FokI*, com isso os sítios de ligação são reconhecidos por distintos TALENs e clivados (revisado por MA; LIU, 2015; ZHENG et al., 2020).

O sistema TALEN é utilizado para introduzir DSBs no genoma. Essas quebras podem ser reparadas tanto por NHEJ que promovem mutação por inserção ou exclusão no sítio danificado, quanto por RH, quando um DNA doador homólogo é fornecido promovendo a introdução de nucleotídeos únicos ou modificações (REYON et al., 2013). No arroz, tem sido descrito na literatura a utilização de TALENs para obtenção de mutações específicas (ZHU et al., 2017). Essa ferramenta foi utilizada para melhorar a qualidade industrial, resistência ao estresse biótico e tolerância ao estresse abiótico. Apesar de ser considerada uma técnica muito trabalhosa devido a construção do motivo para se ligar no sítio específico no DNA, os TALENs foram relatados como uma ferramenta capaz de ser aplicada para o melhoramento de arroz (LI et al., 2012; LI et al., 2016; MA et al., 2015; revisado por TIWARI; LATA, 2019; revisado por VIANA et al., 2019; YANG, et al., 2018a).

A técnica de Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespaçadas (CRISPR), é a quarta ferramenta de edição de genomas, considerada revolucionária, por atuar em diferentes áreas da biologia. Os estudos mais recentes de edição de genomas de arroz utilizaram a tecnologia CRISPR, uma vez que, apresenta maiores frequências de mutações comparadas à TALEN (revisado por VIANA et al., 2019).

O mecanismo de CRISPR é oriundo do sistema imunológico de bactérias e arqueas que detectam e degradam os ácidos nucleicos invasores de vírus e plasmídeos (BARRANGOU et al., 2007; DOUDNA; CHARPENTIER, 2014). Nesse processo acontece a clivagem do DNA invasor através da proteína Cas9, que é guiada por um curto RNA que parecia com uma sequência específica do DNA alvo. Esse mecanismo é utilizado para introduzir alterações específicas em genomas de procariotos e eucariotos (ESTRELA; CATE, 2016; JIANG et al., 2013; NISSIM et al., 2014; ANZALONE et al., 2020).

O loco CRISPR é composto por uma série de pequenas sequências palindrômicas de 21 a 48 pares de bases, regularmente espaçadas por sequências de tamanhos variáveis de 26 até 72 pares de bases, oriundas das sequências extracromossômicas ou plasmidial (*spacers*), e por genes Cas (proteínas associadas do CRISPR) (DEVEAU; GARNEAU; MOINEAU, 2010; DOMINGUEZ; LIM; QI, 2016; KIM et al., 2013). O sistema CRISPR/Cas9 pode

ser de três tipos, classificados como tipo I, tipo II e tipo III, conforme a proteína associada, sendo a Cas3, Cas9 e Cas10, respectivamente (MAKAROVA et al., 2011). Nas categorias I e III, geralmente encontrado em bactérias e arqueas, a sequência de DNA invasor é clivado pela atuação de inúmeras proteínas Cas que formam um complexo com RNA CRISPR gerando ribonucleoproteínas. No sistema II, que é visto somente em bactérias, a Cas9 é guiada por um RNA guia (gRNA) sendo a única proteína que promove a quebra de dupla fita de DNA (MAKAROVA et al., 2011; SONTHEIMER; BARRANGOU, 2015). Com isso, a tecnologia CRISPR/Cas aplicada na edição de genomas, é conhecida pelo uso do mecanismo do tipo II proveniente da bactéria *Streptococcus pyogenes* (DOUDNA; CHARPENTIER, 2014; GASIUNAS et al., 2012; revisado por BHAMBHANI et al., 2021).

Existe três etapas para que o mecanismo da edição gênica do CRISPR/Cas9 aconteça, sendo elas: adaptação, expressão e interferência (VASCONCELOS; FIGUEIREDO, 2015). Em procariotos, a etapa de adaptação é denominada quando as enzimas Cas1 e Cas2 clivam o DNA invasor em sequências pequenas, geradas pela resposta de defesa do mecanismo das bactérias. Após ocorre a inserções de algumas dessas sequências determinadas *spacers* no loco CRISPR no genoma bacteriano entre as sequências repetidas. Dessa forma, a bactéria consegue produzir uma memória adaptativa como resposta mais rápida aos próximos ataques de DNA exógeno oriundos de fagos ou plasmídeos (VASCONCELOS; FIGUEIREDO, 2015).

A etapa de expressão, se caracteriza pelo reaparecimento do DNA estranho e o loco CRISPR é ativado e transcrito na célula da bactéria, produzindo uma molécula longa de pré-RNA não codificador (pré-crRNA). O pré-crRNA que se hibridiza com outro RNA não codificante conhecido como *tracrRNA* (trans ativador de crRNA), gera uma cadeia dupla de RNA, que com a atuação da enzima RNase III transforma em uma molécula híbrida conhecida como RNA guia (gRNA), que apresenta um papel indispensável por ativar e direcionar a nuclease Cas9 para o DNA exógeno (BARRANGOU et al., 2007; ESVELT et al., 2013; JINEK et al., 2012; KHATODIA et al., 2016). A extremidade 5' do gRNA é composta por 20 nucleotídeos que se ligam por meio da atividade da Cas9, promovendo o pareamento de bases DNA-RNA em um fragmento alvo. Para a

etapa de interferência, é necessária a presença de um motivo protoespaçador adjacente (PAM), que é responsável pelo recrutamento e por ativar a Cas9, na jusante do DNA exógeno, demonstrando 5'-NGG-3' ou 5'-NAG-3', que se torna um requisito fundamental para clivar o DNA (GASIUNAS et al., 2012, revisado por BORTESI; FISHER, 2015; revisado por ZHU et al., 2017). Finalmente, o complexo determinado gRNA-Cas realiza o corte do DNA invasor, evitando a replicação do vírus ou do DNA plasmidial e propiciando a imunidade à célula hospedeira bacteriana (WIEDENHEFT et al., 2012; MARRAFFINI, 2015; BORTESI et al., 2015; CHEN et al., 2019b; ANZALONE et al., 2020; NIZOLLI et al., 2023).

Esse sistema de defesa das bactérias foi ajustado para clivar o DNA de eucariotos através do uso de RNAs guia único (sgRNA), que é sintetizado para se ligar na região do genoma que interessa realizar a introdução das quebras e posteriormente o reparo (VASCONCELOS; FIGUEIREDO, 2015). O local de ligação do gRNA deve estar próximo a um NGG-PAM. Em genomas vegetais o NGG-PAM é bastante presente e em arroz é encontrado um NGG-PAM a cada 9,8 pb (revisado por ZHU et al., 2017).

Para que o sistema CRISPR seja eficiente é essencial o processo de reparo da DSB, podendo utilizar como sistema de reparo HR e NHEJ. Para o mecanismo NHEJ são realizadas pequenas deleções e esporadicamente ocorre a introdução de inserções no genoma. Com isso, ocorre mutações perda de função ocasionadas pela alteração da sequência, que promove modificações na fase de leitura ou alterações nos aminoácidos, que podem ser vistas no produto final do gene (revisado por CHOUDHARY et al., 2017). No mecanismo HR, o molde do DNA doador serve como fonte de informações para reparo, que é copiado para o cromossomo que foi quebrado, para poder restaurar a sua respectiva integridade. As variações do DNA doador serão copiadas pelo mecanismo de recombinação no cromossomo. Mas para que ocorra reparo por HR, no organismo alvo, além de introduzir o gRNA e a Cas 9, deve-se fornecer DNA doador (revisado por VIANA et al., 2019).

O sistema CRISPR/Cas9 vem sendo adaptado de acordo com as demandas. Dentre as inovações da tecnologia se pode destacar *base editing* e *prime editing*. A edição de genomas utilizando a tecnologia *base editing* permite

a geração de conversões de bases, de forma programável e irreversível, sem exigir DSBs. *Base editing* consiste em uma dCas9 que possui três versões, variando de acordo com as bases alteradas (CHEN et al., 2019b; ZHU et al., 2020; LIU et al., 2022). A inativação de ambos os domínios de nuclease (RuvC e HNH) gera a endonuclease deficiente Cas9 (dCas9), que não corta o DNA, mas é capaz de reconhecer adequadamente quando ligada ao complexo do sgRNA e serve como uma ponte para recrutar efetores proximais para sítios genômicos específicos (SODA et al., 2018; LIU et al., 2022). O dCas9 pode ser fusionada ao domínio de citosina desaminase, sendo denominada *Cytosine base editors* (CBEs), e, quando fusionada ao domínio adenosina deaminase, é denominada *adenine base editors* (ABEs), que foram desenvolvidas para produzir transições de base C:G para-T:A e A:T-para-G:C, respectivamente (CHEN et al., 2019b; ZHU et al., 2020; LIU et al., 2022). O dCas9 pode também ser fusionada ao uracil glycosylase inhibitor (UGI), sendo capaz de impedir a excisão de U durante o reparo, aumentando a eficiência de CBEs (CHEN et al., 2019b; ZHU et al., 2020). Isso porque, no caso de CBEs, a citosina desaminase converte citosinas (C) em uridinas (U) na fita simples de DNA (ssDNA), e a incompatibilidade U:G pode ser reparada para U:A, resultando em um par de bases T:A. Fusões com inibidor da uracil glicosilase (UGI) são capazes de prevenir a excisão de U (o que retornaria a sequência original C:G) e aumentam significativamente a eficiência de edição de CBEs (CHEN et al., 2019b; ZHU et al., 2020; LIU et al., 2022). Para ABEs, adenina desaminase converte adeninas (A) em inosinas (I), que podem ser reconhecidas como guaninas (G). Assim, a função da Cas9 modificada é apenas de se ligar ao DNA, guiada pela molécula de sgRNA, direcionando assim o complexo para que a citosina (ou adenosina) desaminase façam a conversão de uma única base no sítio-alvo (CHEN et al., 2019b; ANZALONE et al., 2020; MISHRA et al., 2020). Já o inibidor UGI altera a via de reparo celular da remoção da uracila (ZHU et al., 2020; NIZOLLI et al., 2023).

*Prime editing* é uma abordagem de edição de genes versátil, podendo introduzir todos os 12 tipos de mutações pontuais possíveis, pequenas inserções e deleções de forma precisa e direcionada sem exigir DSBs ou moldes de DNA do doador (ANZALONE et al., 2019; ANZALONE et al., 2020; ZHU et al., 2020).

Essa tecnologia requer a fusão de uma nCas9 à uma transcriptase reversa (RT) projetada. O nCas9 RT irá se fundir a um prime editing guide RNA (pegRNA), que irá especificar o sítio alvo em sua sequência e codificar o corte desejado. A nCas9 apresenta um dos sítios de corte mutados, sendo conhecida como D10A quando a mutação inativa RuvC e H840A quando a mutação inativa HNH. A nCas9 D10A realiza o corte na fita complementar ao pegRNA, enquanto que a nCas9 H840A realiza o corte na fita não complementar ao pegRNA (ZHU et al., 2020). O *prime editing* usa a extremidade 3' recém-liberada no sítio de DNA alvo para iniciar a transcrição reversa usando a sequência especificada em pegRNA como modelo. Isso porque pegRNA contém um modelo para RT codificando as edições desejadas para hibridização da extremidade 3' da fita de DNA cortada para iniciar a transcrição reversa, codificando o que for desejado editar (ANZALONE et al., 2019; ZHU et al., 2020). A transcrição reversa gera então um retalho de DNA 3'; que contém a sequência editada e, finalmente, leva à incorporação dessa sequência no genoma. O sistema H840A difere do D10A pelo uso de um sgRNA adicional para cortar a fita não editada em um local distante do alvo indicado por pegRNA, aumentando a eficiência de edição (LIU et al., 2022). No entanto, cortar a fita não editada também aumenta a frequência de inserções e deleções indesejadas (*indels*) no local de destino (CHEN et al., 2021; NIZOLLI et al., 2023).

O sistema CRISPR/Cas9 vem apresentando resultados promissores para induzir mutações em genes específicos em arroz, visando inúmeras finalidades, especialmente para características agronômicas desejáveis, podendo ser uma alternativa promissora para a biofortificação do Fe. Além disso, apresenta vantagens como a obtenção de manipulações rápidas e eficazes em genomas de plantas, sendo uma ferramenta renovadora, com o propósito de caracterização funcional dos genes, bem como para o melhoramento genético propriamente dito, para as culturas e plantas cultivadas (VAZQUEZ-VILAR et al., 2016; revisado por BHAMBHANI et al., 2021).

O sistema de edição gênica CRISPR/Cas9 pode ser uma solução quando comparada com as técnicas de transgenia, podendo ser capaz de resolver situações biológicas que são impedidas por essa técnica. Além disso, é a alternativa chave quando alimentos transgênicos não são aceitos pelos

consumidores, uma vez que, as plantas que tiveram o genoma editado por meio do sistema CRISPR/Cas9 não se enquadram na regulamentação como transgênico. Isso acontece, pois, a construção contendo as sequências exógenas (promotor+gene\_Cas/promotor+gRNA/promotor+gene\_seleção) inseridas no genoma da planta, é removida pela segregação (ARAKI; ISHII, 2015) ou então é utilizado o sistema ribonucleoproteínas, no qual não é necessário a introdução de sequências exógenas no genoma (CHEN et al., 2019b). Com isso, demonstrando que pode ser a opção valiosa na produção de culturas biofortificadas com Fe (CONNORTON et al., 2017a; LI et al., 2022).

## **2.8 Outros micronutrientes e elementos contaminantes encontrados no arroz**

Além do Fe, outros micronutrientes são requeridos para manter a saúde humana. Os micronutrientes são conhecidos como constituintes na dieta que não contribuem na fonte de calorias, porém são essenciais para o equilíbrio do corpo humano e as funções vitais, mesmo que exigidas em quantidades baixas. Vitaminas (solúveis em gordura e em água) e minerais (SHERGILL-BONNER, 2017) são micronutrientes responsáveis por promover vários benefícios ao bem estar, como a restauração dos tecidos, desenvolvimento e saúde dos ossos e dentes, atuando como cofatores enzimáticos e coenzimas para inúmeros sistemas enzimáticos. Além disso, contribuem na regulação e coordenação da maior parte das funções bioquímicas, fisiológicas e corporais do corpo humano (revisado por AWUCHI et al., 2020).

Os treze elementos essenciais importantes para animais e seres humanos, dentre eles o ferro e o cálcio, são oriundos do solo e não são capazes de serem sintetizados por organismos vivos (CORVALLIS, 2018; USDA 2016). Com isso, as plantas são determinadas como a principal fonte de nutrientes para atender a quantidade necessária de animais e seres humanos, mesmo que alguns deles sejam necessários em pouca quantidade. Dentre os elementos traços, o Cu, Fe, Mn, Se e Zn, devem ser consumidos pelo menos 100 mg por dia. (PRASHANTH et al., 2015; revisado por ZAFEIRAKI et al., 2022)

A baixa ingestão de micronutrientes, também conhecida como deficiência de micronutrientes ou deficiência alimentar, é devido o consumo insuficiente de ao menos um dos elementos essenciais exigidos pela saúde dos seres humanos. Mais de dois bilhões de pessoas de países em desenvolvimento sofrem com a deficiência de micronutrientes, que são capazes de causar muitos distúrbios, principalmente bócio e anemia. Estudos indicam que 10% de todas as mortes de crianças estão relacionadas com deficiência de micronutrientes (WESTPORT, 2012; AWUCHI et al., 2020).

Por outro lado, além do baixo teor de alguns micronutrientes, alimentos da cesta básica podem apresentar alguns elementos potencialmente tóxicos (PTEs), sendo mais um fator de risco para à saúde humana e de animais (CORGUINHA et al., 2015; LONDONIO et al., 2019; PANDELOVA et al., 2012). Com isso, foi verificado que o maior contato dos seres humanos com os PTEs, cerca de 90%, está associada pela ingestão e alimentos e águas que estão contaminadas (CHEN et al., 2018; KHAN et al., 2013). O desenvolvimento acelerado no século atual devido as atividades da indústria e agricultura, crescimento urbano e mineração demonstrou o impacto e o acréscimo de alguns contaminantes PTEs na natureza (solo, água e ar), dentre eles: mercúrio (Hg), cádmio (Cd), chumbo (Pb), arsênio (As), cromo (Cr VI) e estanho (Sn) (ALINEJAD et al., 2016; FAKHRI et al., 2018; KHAN et al., 2013; ZAFARZADEH et al., 2017; FAKHRI et al., 2019a). Inúmeras complicações na saúde são capazes de serem desencadeados devido ao consumo de alimentos contendo PTEs, como a genotoxicidade, carcinogenicidade, mutagenicidade, teratogenicidade, neurotoxicidade, distúrbios endócrinos, problemas no sistema imunológico e também traz prejuízos na conduta psicossocial (KHAN et al., 2013; FAKHRI et al., 2019b; HESHMATI et al., 2019; REZAEI et al., 2019; KHANEGHAH et al., 2020).

Diante desses fatores, problemas de deficiência causada pela ingestão alimentar insuficiente, como observado na desnutrição, demonstra a importância de iniciativas para promover o consumo adequado de micronutrientes em alimentos vegetais (BLANCQUAERT et al., 2017). Também, o uso combinado de alimentos e farinhas para segurar a complementação de nutrientes (AWUCHI et al., 2019a; AWUCHI et al., 2019b), como frequentemente utilizados em

indústrias de alimentos (revisado por AWUCHI et al., 2020). Com isso, é de extrema importância estudos que caracterizam a variabilidade dos genótipos e elementos essenciais para futuras pesquisas como biofortificação de minerais (FERRARI et al., 2022; ZULFIQAR et al., 2023), assim como, para identificar genótipos com menor acúmulo de PTEs (YANG et al., 2023; revisado por VIANA., 2022).

**3 CAPÍTULO I - Conteúdo de minerais e elementos tóxicos em grãos de arroz cultivados no Sul do Brasil**

### **3. Conteúdo de minerais e elementos tóxicos em grãos de arroz cultivados no Sul do Brasil**

#### **3.1 Introdução**

A predominância de dietas não diversificadas à base de cereais e vegetais, que são pobres em micronutrientes, é a principal razão para a deficiência de micronutrientes nas populações dos países do terceiro mundo. Fatores antinutricionais reduzem ainda mais a disponibilidade desses minerais, impedindo a absorção no intestino. Além disso, processos como descasque, polimento e moagem de cereais os tornam ainda mais pobres em micronutrientes (RAWAT et al., 2013). Elementos essenciais como ferro (Fe), zinco (Zn), Manganês (Mn), Selênio (Se), Cobre (Cu), entre outros, são necessários para humanos em quantidades inferiores a  $100 \text{ mg dia}^{-1}$  (PRASHANTH et al., 2015).

O Fe é o elemento traço essencial mais abundante no corpo humano. A anemia é um dos problemas ocasionados pela deficiência de Fe, prejudica o crescimento, retarda o desenvolvimento das crianças, e enfraquece a imunidade em bebês, crianças pequenas e mulheres grávidas (WHO/FAO, 1998). O Zn apresenta um papel importante para o corpo dos seres humanos, influencia em distintos processos metabólicos e é responsável por controlar diferentes processos enzimáticos que resulta em uma boa saúde da população. A deficiência de Zn desencadeia distintos transtornos fisiológicos e mentais, promovendo abortos em mulheres grávidas (KREŽEL; MARET, 2016; TERRIN et al., 2015).

O Mn está envolvido em muitos processos biológicos, e apesar da deficiência de Mn ser rara, se ocorrer pode ocasionar distúrbios fisiológicos como crescimento deficiente, redução da fertilidade, defeitos de nascença e hipocolesterolemia (MARTINS et al., 2020). O Se é responsável por ser integrante das selenoproteínas e algumas enzimas antioxidantes, atua na regulação do sistema imunológico e também protege dos efeitos tóxicos de metais pesados. A deficiência do Se promove vários distúrbios patológicos, a degeneração de tecidos e órgãos, aumento da infertilidade em homens, câncer

de próstata, asma, arritmia cardíaca, risco de acidente vascular cerebral e síndrome da morte súbita infantil (revisado por Kieliszek; Blazejak, 2016). O Cu é cofator de muitas enzimas redox, atua no metabolismo do Fe, e a deficiência de Cu tem consequências adversas ao longo da vida, como anormalidades de bebês e alterações no metabolismo do colesterol (BOST et al., 2016).

Aumentar o acúmulo e a disponibilização de minerais em cereais como arroz, trigo e milho, é uma das estratégias para redução da deficiência de micronutrientes nos países em desenvolvimento (RAWAT et al., 2013). Para mais da metade da população mundial o arroz (*Oryza sativa* L.) é responsável por até 70% das calorias diárias (MAJUMDER, et al., 2019), e em alguns países é a única fonte de nutrição (YANG et al., 2016). Desconsiderando os países da Ásia, o Brasil é o principal produtor e consumidor de arroz, e o estado do Rio Grande do Sul, localizado na região Sul do País, é responsável por > 70% da produção nacional. Por isso, a disponibilização de cultivares de arroz com maior acúmulo de minerais seria uma abordagem sustentável para aquelas pessoas que consomem principalmente arroz e tem acesso limitado a alimentos diversificados (MAJUMDER et al., 2019). Nesse caso, a planta melhorada deve ter maior capacidade de captação de minerais do solo, maior translocação desses elementos para os grãos e internalização dos minerais no endosperma (RAWAT et al., 2013).

Quando cultivado em solos contaminados, o arroz acumula maiores quantidades de Arsênio (As) e Cádmiio (Cd) que outros cereais, tornando-o a principal fonte alimentar desses elementos potencialmente tóxicos para humanos (HU et al., 2013) em populações com alto consumo de arroz. O As é um elemento prevalente no ambiente e pode entrar no sistema alimentar através da ingestão de alimentos produzidos em solo ou água contaminados. O As apresenta as formas orgânica e inorgânica, sendo o iAs (arsênico inorgânico) classificado como um carcinógeno humano classe 1 sem limiar. Dentre as espécies de As, o arsenito (iAsIII) é a mais encontrada no arroz. Problemas com contaminação por As têm sido reportados em diferentes países, principalmente da Ásia (HASSAN et al., 2017). No Brasil também tem sido verificada a presença de As em arroz (KATO et al., 2019; MONTEIRO et al., 2020).

O Cd é um elemento tóxico que apresenta alta taxa de transferência solo-planta, o que torna um contaminante potencial da cadeia alimentar. O consumo

de arroz contaminado com Cd causa a doença *itai-itai*, que ocorre principalmente em mulheres, e causa danos renais graves, osteoporose generalizada, osteomalácia e múltiplas fraturas ósseas (revisado por Satarug, 2018). O Chumbo (Pb) também pode ser acumulado em arroz e representar um problema de segurança alimentar (CHENG et al., 2006; NORTON et al., 2014). O Pb é um metal pesado tóxico que afeta quase todos os órgãos do corpo, com efeito intenso no sistema nervoso. Ainda, a exposição ao Pb está associada com aborto, redução da fertilidade masculina, distúrbio sanguíneo, redução do desempenho cognitivo, anemia e aumento da pressão arterial e graves danos ao cérebro e aos rins. A contaminação por chumbo ocorre principalmente pela ingestão de alimento e água contaminados (WANI et al., 2015). A disponibilização de cultivares de arroz com baixo acúmulo de As, Cd e Pb é uma das estratégias para mitigar a contaminação de populações vulneráveis (LEE et al., 2016; ZHAO; WANG, 2020).

O melhoramento genético convencional e a engenharia genética são técnicas utilizadas para criar novas cultivares de arroz com maior acúmulo de minerais e menor concentração de elementos tóxicos nos grãos (RAWAT et al., 2013; ZHAO; WANG, 2020). Biofortificação dos elementos essenciais via melhoramento convencional é a ferramenta mais amplamente aceita, pois é a mais econômica e sustentável do que as estratégias agronômicas (adicionando fertilizantes) e engenharia genética (GARG et al., 2018). No melhoramento convencional, o processo de seleção depende da disponibilidade de variabilidade genética (BUSANELLO et al., 2020; ROY; SHARMA, 2014). Por isso, estudos de variabilidade genética para caracteres de interesse agronômico permitem o uso e a conservação de recursos genéticos de forma eficiente (BUSANELLO et al., 2020; ALJUMAILI et al., 2018). Ainda, possibilitam a caracterização de genótipos e a identificação de acessos superiores.

A quantificação dos minerais e elementos tóxicos é uma das maneiras para avaliar a variabilidade genética. Espectrometria de massa de plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) é uma ferramenta precisa e altamente sensível, que permite a análise multielementar de inúmeras matrizes (BULSKA; WAGNER, 2016), e tem sido utilizado como quantificação de elementos traços no arroz (MONTEIRO et al., 2020). No entanto, deve-se considerar que diferenças fenotípicas podem não ser apenas consequência da variabilidade

genética, mas também do efeito do ambiente (NAJAFIAN, et al., 2010; YAN; KANG, 2003), principalmente quando se trata de caracteres complexos, como o acúmulo de minerais no grão (DU et al., 2013).

Considerando a importância da qualidade do arroz na alimentação e saúde humana e a participação do melhoramento genético nesse âmbito, esse estudo teve como objetivo caracterizar o acúmulo de minerais e de elementos tóxicos, assim como a influência do ambiente sobre o acúmulo de minerais em grãos, de uma coleção de arroz cultivada no estado do Rio Grande do Sul, Brasil. Foi utilizado o ICP-MS para quantificar elementos traços (Fe, Zn, Se, Mn e Cu) e elementos tóxicos (As, Cd e Pb) nos grãos de 82 genótipos de arroz. Até o momento esse é o primeiro estudo avaliando elementos traços em muitos genótipos utilizados no Brasil, bem como o efeito da safra no acúmulo desses elementos.

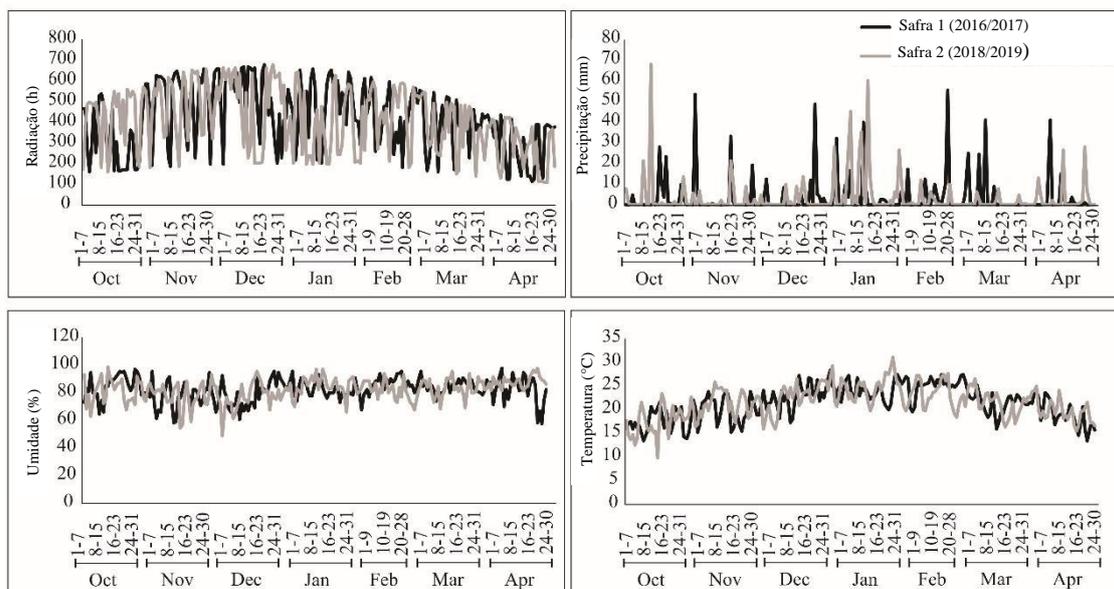
## **3.2 Material e Métodos**

### **3.2.1 Material vegetal**

Uma coleção com 82 acessos de arroz foi utilizada nesse estudo (Tabela 2). A coleção é composta por cultivares elite desenvolvidas no país, cultivares estrangeiras, híbridos e linhas mutantes, pertencentes as subespécies *indica* e *japonica*. O cultivo foi feito no sistema irrigado com inundação permanente, na Estação Experimental Terras Baixas da Embrapa, localizada no Capão do Leão, Rio Grande do Sul, Brasil, nas safras 2016/2017 e 2018/2019, em áreas diferentes no mesmo campo experimental. Nessa área, o solo é classificado como Planossolo Háplico (Albaqualf) (SANTOS et al., 2018), com as coordenadas geográficas (31°46'19" S, 52°20'33"L) a 17m de altitude, características comuns de uma região de cultivo de arroz na região sob sistema irrigado por inundação. De acordo com a classificação climática de Köppen, o clima local é do tipo Cfa, caracterizado como subtropical úmido, sem estação seca definida e com verões quentes (WREGGE et al., 2012). As condições climáticas são mostradas na Figura 4.

**Tabela 2.** Genótipos de arroz (*Oryza sativa* L.) utilizados para a quantificação dos elementos essenciais e tóxicos.

<b>Código</b>	<b>Genótipo</b>	<b>Código</b>	<b>Genótipo</b>	<b>Código</b>	<b>Genótipo</b>	<b>Código</b>	<b>Genótipo</b>
1	Amaroo	22	BRS Pampa	43	IRAT 162	64	Rexoro
2	Arbório	23	BRS Pampeira	44	IRGA 417	65	Sambuc
3	Austral	24	BRS Pelota	45	IRGA 418	66	SC 173
4	BR-IRGA 409	25	BRS Querência	46	IRGA 419	67	SC 460
5	BR IRGA 410	26	BRS Sinuelo CL	47	IRGA 420	68	SCS 112
6	BR IRGA 412	27	Cachinho	48	IRGA 424 CL	69	SCS 114 Andosan
7	BR IRGA 413	28	Cacho Grande	49	IRGA 427	70	SCS 115 CL
8	BR-IRGA 414	29	Carnaroli	50	IRGA 428	71	SCS 116 Satoru
9	Brilhante	30	Empasc 100	51	IRGA 429	72	SCS 117 CL
10	BRS 358	31	Empasc 101	52	Jasmine	73	SCS 118 Marques
11	BRS 6 Chui	32	Empasc 102	53	Jasmine 85	74	SCS 119 Rubi
12	BRS 7 Taim	33	Empasc 103	54	Koshihikari	75	SCS 121 CL
13	BRS 902	34	Empasc 104	55	Lemont	76	SCS BRS 111
14	BRS A701 CL	35	Empasc 105	56	M1150	77	SCS BRS Tio Taka
15	BRS AG	36	Epagri 106	57	M1313	78	Selenio
16	BRS Agrisul	37	Epagri 107	58	M1410	79	Tetep
17	BRS Atalanta	38	Epagri 108	59	Meio Chumbinho	80	Tomoe Mochi
18	BRS Bojuru	39	Epagri 109	60	Nowrin Mochi	81	TOX 514-16-101-1
19	BRS CIRAD 302	40	GURI INTA CL	61	OR 63-252	82	Zebu
20	BRS Formoso	41	IAS 12-9 Formosa	62	PUITÁ INTA CL		
21	BRS Fronteira	42	IRAT 124	63	Qualimax		



**Figura 4.** Perfil das condições climáticas das duas safras (2016/2017 e 2018/2019), onde os genótipos de arroz foram cultivados, na Estação Experimental Terras Baixas da Embrapa, Capão do Leão, Rio Grande do Sul, Brasil.

O delineamento experimental foi o de blocos ao acaso, com três repetições, em que cada genótipo foi semeado em linhas de 1,0 metro de comprimento na safra 2016/2017 e linhas de 1,5 m na safra 2018/2019, espaçadas em 0,20 m, e cada linha consistia em uma unidade experimental. A semeadura foi feita manualmente, em densidade de 45 sementes viáveis por metro linear. Todo o manejo fitotécnico e fitossanitário foi realizado conforme as recomendações técnicas para a cultura do arroz para o Sul do Brasil (SOSBAI, 2018).

No momento em que cada genótipo atingiu a maturidade fisiológica dos grãos, a colheita foi feita de forma manual. Após a secagem e trilha das panículas, os grãos passaram por beneficiamento em um mini engenho de provas (SUZUKI, model S21, MT). As amostras foram divididas em duas partes: uma parte foi apenas descascada e a outra foi descascada e polida, sendo classificadas como arroz integral e branco, respectivamente.

### 3.2.2 Quantificação de elementos traço desejados e indesejados em grãos

As amostras de arroz integral e branco foram moídas em moinho (MARCONI, modelo MA020, Brazil) com peneira de abertura 0,25-mm, na

Universidade Federal de Pelotas, pesadas (aproximadamente 0,1 g) e acondicionadas em tubos de polipropileno estéreis de 15 mL. A quantificação dos elementos foi feita na Universidade Federal do ABC. Os elementos Fe, Zn, Se, Mn e Cu foram quantificados nas duas safras, enquanto que os elementos Pb, As e Cd foram quantificados apenas na segunda safra.

O ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ) (65% m m<sup>-1</sup>, Synth, Brasil) utilizado na digestão foi purificado com sistema de destilação e sub-ebulição a DST-1000 Teflon (Savillex, USA), e a água ultrapura (resistividade 18,2 M $\Omega$  cm) também passou por sistema de purificação (Master System All, Gehaka, Brasil). Foi adicionado 1 mL de  $\text{HNO}_3$  aos tubos, os quais foram mantidos com as tampas semiabertas durante 24h, para o processo de pré-digestão. Para a digestão, os tubos foram transferidos para banho-maria (modelo SL1522L, Solab, Piracicaba, Brasil) em 90°C, durante 4h, passando por agitação a cada 30 min. Após a digestão, quando as amostras atingiram temperatura ambiente, completou-se o volume de 15 mL com água ultra pura. Posteriormente procedeu-se análise por espectrômetro de massa de plasma indutivamente acoplado (ICP-MS 7900, Agilent, Hachioji, Japão). O ICP-MS foi equipado com uma célula de colisão para minimizar a interferência isobárica e/ou poliatômica.

As condições operacionais do ICP-MS ocorreram de acordo com Paniz et al. (2018). Argônio (99,9999%, White Martins, Brasil) e Hélio (99,99%, White Martins) de alta pureza foram usados para a geração plasma e a colisão de gás, respectivamente. Foi feito uma diluição sequencial de uma solução padrão multielementar comercial contendo 10 mg L<sup>-1</sup> dos analisadores em 5% v v<sup>-1</sup>  $\text{HNO}_3$  (STD-3, PerkinElmer, USA) para calibração do equipamento. A concentração das curvas de calibração para todos os elementos variou de 1 a 200  $\mu\text{g L}^{-1}$ . A solução de Yttrium (50 $\mu\text{g L}^{-1}$ , em 5% de v v<sup>-1</sup>  $\text{HNO}_3$ ) foi utilizada como um padrão interno para avaliar a resposta do equipamento durante a análise.

As curvas de calibração para todos os elementos foram preparadas utilizando sete pontos de calibração (1,0, 5,0, 10,0, 20,0, 50,0, 100 e 200 $\mu\text{g L}^{-1}$ ), exceto para o Fe, que foram dez pontos de calibração (1,0, 5,0, 10,0, 20,0, 50,0, 100, 200, 500, 1000, 2000 e 5000  $\mu\text{g L}^{-1}$ ). Os coeficientes de determinação ( $R^2$ ) para todos os elementos foram superiores que 0,999. A qualidade das curvas de calibração foi avaliada pela análise de um material referência certificado (CRM)

de água natural (NIST 1640a, *National Institute of Standards and Technology*, Gaithersburg, EUA). A veracidade do método analítico foi avaliada pela análise de dois materiais de farinha de arroz: o material de referência (RM) Embrapa/USP C1002a, produzido desde um estudo colaborativo entre Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa, Brasil) e Universidade de São Paulo (USP, Brasil), e o CRM NIST 1568b (Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia). Esse material foi analisado em duas triplicatas (em dias diferentes) e os resultados foram demonstrados na tabela 3.

**Tabela 3.** Concentração elementar em materiais de referência certificado (NIST 1640a e NIST 1568b) e material de referência (Embrapa/USP C1002a), e o viés relativo (%) para cada elemento. Os resultados são expressos com os valores médios  $\pm$  desvio de padrão (desvio de padrão relativo), n=6.

Elemento	Concentração ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )			Concentração ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )					
	NIST 1640a			Embrapa/USP C1002a			NIST 1568b		
	Valores observados	Valores certificados	Viés (%)	Valores observados	Valores de referência	Viés (%)	Valores observados	Valores certificados	Viés (%)
$^{55}\text{Mn}$	41,35 $\pm$ 1,63 (3,9)	40,39 $\pm$ 0,36	2,4	17,495 $\pm$ 1,180 (6,7)	17,725 $\pm$ 881	-1,3	18,476 $\pm$ 1,428 (7,7)	19,200 $\pm$ 1,800	-3,8
$^{57}\text{Fe}$	37,72 $\pm$ 1,35 (3,6)	36,80 $\pm$ 1,80	2,5	12,206 $\pm$ 950 (7,8)	12,891 $\pm$ 1,777	-5,3	6,507 $\pm$ 497 (7,6)	7,420 $\pm$ 440	-12,3
$^{63}\text{Cu}$	92,38 $\pm$ 8,70 (9,4)	85,75 $\pm$ 0,51	7,7	1,635 $\pm$ 152 (9,3)	1,533 $\pm$ 73	6,7	2,369 $\pm$ 95 (4,0)	2,350 $\pm$ 160	0,8
$^{66}\text{Zn}$	59,13 $\pm$ 6,80 (11,5)	55,64 $\pm$ 0,35	3,9	14,546 $\pm$ 993 (6,8)	15,815 $\pm$ 933	-8,0	17,535 $\pm$ 1,949 (11,1)	19,420 $\pm$ 260	-9,7
$^{82}\text{Se}$	19,31 $\pm$ 1,20 (6,2)	20,13 $\pm$ 0,17	-4,1	121,9 $\pm$ 8,9 (7,3)	137,0 $\pm$ 30,4	-11,0	347,7 $\pm$ 23,8 (6,9)	365,0 $\pm$ 29,0	-4,7
$^{75}\text{As}$	7,69 $\pm$ 0,41 (5,4)	8,07 $\pm$ 0,07	-4,7	153,6 $\pm$ 12,6 (8,2)	169,0 $\pm$ 15,9	-9,1	255,8 $\pm$ 26,4 (10,3)	285,0 $\pm$ 14,0	-10,2
$^{208}\text{Pb}$	11,42 $\pm$ 1,27 (11,1)	12,10 $\pm$ 0,05	-5,6	13,30 $\pm$ 2,36 (7,3)	13,40 $\pm$ 1,46	-0,7	8,73 $\pm$ 0,70 (8,0)	8,00 $\pm$ 3,00	9,1
$^{112}\text{Cd}$	3,76 $\pm$ 0,14 (3,6)	3,99 $\pm$ 0,07	-5,8	4,32 $\pm$ 0,35 (8,1)	4,36 $\pm$ 0,52	-0,9	19,65 $\pm$ 2,37 (12,1)	22,40 $\pm$ 1,30	-12,3

Vale ressaltar que a avaliação de veracidade e precisão foi realizada de acordo com as diretrizes da EURACHEM (EURACHEM, 2014). O viés relativo foi usado para estimar a veracidade, e a precisão foi avaliada em termos de repetibilidade e precisão intermediada usando o desvio padrão relativo (DPR) das medidas. Com base nos resultados apresentados na tabela 3, o método usado para a quantificação de analitos em arroz apresentou precisão adequada. A veracidade (viés relativo variou de 12,3% até 9,1%) e precisão ( $DPR \leq 12\%$ ) foram adequados para o declarado propósito. Além disso, é importante notar que os valores observados mostrados na tabela 3, não apresentaram diferenças significativas pelo teste t de Student, com o nível de confiança de 95%, dos valores certificados para NIST 1640a e NIST 1568b, e os valores de referência para a Embrapa/USP C12002a.

As amostras em branco foram submetidas pelo mesmo procedimento das amostras regulares e analisadas pela ICP-MS, e valores brancos foram insignificantes para todos os analitos. Os limites de detecção (LODs) (Tabela 4) foram calculados a partir dos valores do branco e do desvio padrão para 10 repetições, levando-se em consideração a massa da amostra (100 mg) e o volume final dos digeridos (15 mL), conforme recomendações do Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO, Brasil) e estudos anteriores (INMETRO, 2016; PEREIRA et al., 2019).

**Tabela 4.** Limites de detecção ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) do método analítico utilizado para análise de elementos traço em grãos integral e branco de diferentes genótipos de arroz.

<sup>55</sup> Mn	<sup>57</sup> Fe	<sup>63</sup> Cu	<sup>66</sup> Zn	<sup>82</sup> Se	<sup>75</sup> As	<sup>208</sup> Pb	<sup>112</sup> Cd
0,0081	0,1105	0,0161	0,0601	0,0958	0,0018	0,0087	0,0009

### 3.2.3 Análise estatística

Os dados de elementos traço foram analisados quanto à normalidade e homogeneidade através dos testes Lilliefors e Bartlett. Posteriormente foi feita análise de variância, usando um modelo linear generalizado, seguida do agrupamento de médias pelo teste Scott-Knott ( $p \leq 0,05$ ). Os elementos apresentaram significância para diferentes fatores e interações, por isso as

médias de cada elemento foram apresentadas de diferentes formas. Foi calculada a distância Euclidiana entre os genótipos, e os valores foram apresentados em heatmap. A matriz de distância foi utilizada para análise de agrupamento hierárquico dos genótipos usando o método de grupos de pares não ponderados com média aritmética (UPGMA). Para estabelecer o número de grupos formados foi calculado o ponto de corte de acordo com o método proposto por Mojena (1977), onde o ponto de corte = média + k (1.25) × DP, onde de K é uma constante e DP é o desvio padrão. Além disso, a análise de correlação de Pearson foi realizada entre os elementos Cd, Pb e As com os minerais essenciais Mn, Fe, Zn, Se e Cu ( $p \leq 0,05$  e  $0,001$ ). As análises foram feitas usando os programas Genes (CRUZ, 2013) e Orange (DEMŠAR et al., 2013).

### **3.3 Resultados e Discussão**

O acúmulo de minerais e elementos tóxicos em grãos de arroz foi influenciado de forma diferente pelos fatores estudados, genótipo, ambiente de cultivo (safra) e processamento (polimento) (Tabela 5). Já se sabe que o polimento e o genótipo influenciam o acúmulo de elementos nos grãos de arroz (MAGANTI et al., 2020; NAITO et al., 2015; PINSON et al., 2015), assim como o ambiente (DU et al., 2013). Embora as duas safras tenham ocorrido no mesmo campo experimental, as áreas foram diferentes, o que pode resultar em algumas alterações nas características do solo. Além disso, as condições ambientais de cada época de colheita (temperatura, umidade do ar e radiação) foram variáveis (Fig. 1), influenciando a expressão dos genes envolvidos na absorção, transporte e acúmulo dos elementos no grão de arroz.

**Tabela 5.** Resumo da análise de variância para o acúmulo de elementos traço em grãos integral e polido de diferentes genótipos de arroz.

FV	GL	QM							
		As	Cu	Fe	Mn	Zn	Se	Cd	Pb
Safra (S)	1	0,02705	378,80	4,87	2049,24	9,89	3,32	0,00001	0,00149
Polimento (P)	1	0,49717*	438,13	14482,73	32701,16	3024,22	0,04	0,00001	0,00109
Genótipo (G)	81	0,14281*	5,45	15,53	74,57	68,38	0,0047	0,00015*	0,00674*
S x P	1	0,00509	142,5003*	138,73	107,45	185,1028*	0,0188*	0,0001	0,00047
S x G	81	-	2,2055*	13,43	41,25	24,8816*	0,0062*	-	-
P x G	81	-	0,66	10,20	28,52	3,58	0,0032	-	-
S x P x G	81	-	0,57	11,429*	28,1931*	4,03	0,0026	-	-
Erro	656	0,00693	0,66	4,25	10,39	5,54	0,0028	0,00001	0,00049
Total	983	14,79	2111,01	21515,21	55649,56	15022,23	6,59	0,01	0,75
Média	-	0,49	2,85	8,69	16,75	18,19	0,11	0,01	0,04
CV(%)	-	17,01	28,46	23,75	19,25	12,94	49,10	31,54	62,73

FV: fonte de variação; S: safra; P: polimento; G: Genótipo; GL: graus de liberdade; QM: quadrado médio; CV: coeficiente de variação.

### 3.3.1 Acúmulo de minerais

O acúmulo de Fe em grãos de arroz foi influenciado pela interação dos três fatores analisados, processamento (polimento), ambiente de cultivo (safra) e genótipo (Tabelas 5 e 6). Considerando a ingestão diária de Fe recomendada para adultos de 8 mg por dia para homens e 18 mg por dia para mulheres (IOM, 2001), e o consumo médio diário de arroz por brasileiros de baixa de renda em restaurantes populares, que é de 180 g por dia (CARRIJO et al., 2018), pode-se verificar que mesmo consumindo o grão integral, nenhum dos genótipos estudados consegue atender essa demanda. Nos genótipos que apresentaram maior acúmulo de Fe no grão integral, a concentração é de  $\sim 17 \text{ mg kg}^{-1}$ , enquanto que em grãos polidos a concentração de Fe é bastante reduzida (Tabela 6). Concentrações similares de Fe foram encontradas 1763 acessos de arroz de diferentes origens geográficas e genéticas (PINSON et al., 2015). Ainda, valores semelhantes foram também identificados em 159 genótipos de arroz (variedades crioulas, parentes silvestres e genótipos de alto rendimento) cultivados na Índia (MAGANTI et al., 2020).

**Tabela 6.** Acúmulo de Fe (mg kg<sup>-1</sup>) em grãos de arroz integral e polido. Considerando grão integral, médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si. Considerando grão polido, médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si, \* e <sup>ns</sup> correspondem a significativo e não significativo, respectivamente, quando se compara grão integral com grão polido dentro de cada safra.

Grão integral					Grão polido				Grão integral					Grão polido			
G	Safra1		Safra2		Safra1		Safra2		G	Safra1		Safra2		Safra1		Safra2	
1	15,5	aA*	13,3	aA*	3,35	bA	5,82	dA	42	12,5	bA*	10,1	bA <sup>ns</sup>	5,87	aB	9,79	cA
2	12,0	bA*	14,7	aA*	5,91	aA	4,45	dA	43	12,5	bA*	12,0	bA*	3,11	bB	8,55	cA
3	11,3	bA*	12,8	aA*	4,67	bA	7,50	cA	44	13,8	aA*	14,2	aA*	3,22	bA	3,53	dA
4	12,5	bA*	15,5	aA*	4,61	bA	4,47	dA	45	13,8	aA*	6,57	bB*	5,40	aB	13,1	bA
5	13,1	aA*	13,4	aA*	3,24	bB	6,54	dA	46	15,2	aA*	11,0	bB*	3,37	bB	7,49	cA
6	11,1	bA*	11,2	bA <sup>ns</sup>	2,45	bB	10,6	cA	47	12,5	bB*	16,0	aA*	3,52	bA	3,65	dA
7	14,4	aA*	12,9	aA*	4,70	bA	5,02	dA	48	12,6	bA*	12,2	bA*	4,21	bA	3,00	dA
8	15,2	aA*	10,4	bB*	3,19	bA	3,88	dA	49	11,0	bA*	10,2	bA*	3,48	bA	3,60	dA
9	11,4	bA*	14,2	aA*	3,94	bA	3,85	dA	50	14,7	aA*	11,5	bA*	3,91	bA	3,53	dA
10	12,4	bA*	9,38	bA*	3,57	bA	4,16	dA	51	12,6	bA*	11,6	bA*	5,09	aA	4,56	dA
11	17,2	aA*	12,8	aB*	4,43	bA	7,23	cA	52	11,8	bA*	8,85	bA*	4,14	bA	4,74	dA
12	14,0	aA*	13,9	aA*	3,31	bA	3,75	dA	53	12,5	bA*	8,56	bB*	6,53	aA	2,77	dB
13	8,26	bA*	10,9	bA*	2,91	bA	3,70	dA	54	12,6	bA*	13,8	aA*	3,57	bA	2,55	dA
14	15,0	aA*	16,7	aA <sup>ns</sup>	5,85	aB	17,8	aA	55	15,4	aA*	11,6	bB*	2,59	bA	5,65	dA
15	8,68	bB*	14,3	aA*	3,80	bA	3,06	dA	56	12,1	bA*	11,4	bA*	4,29	bA	4,04	dA
16	15,7	aA*	12,8	aA*	6,97	aA	5,46	dA	57	12,9	bA*	10,8	bA*	4,89	bA	3,95	dA
17	17,0	aA*	12,6	aB*	5,57	aA	3,97	dA	58	12,0	bA*	11,5	bA*	5,00	aA	4,39	dA
18	9,51	bA*	12,2	bA*	2,57	bA	3,11	dA	59	13,2	aA*	10,6	bA*	5,45	aA	2,77	dA
19	13,0	aA*	11,7	bA*	6,45	aA	7,07	cA	60	10,1	bA*	13,0	aA*	2,44	bA	3,04	dA
20	11,4	bB*	16,0	aA*	6,66	aA	3,58	dA	61	11,0	bA*	13,1	aA*	3,44	bB	7,19	cA
21	11,3	bA*	12,5	aA*	3,52	bA	5,95	dA	62	15,6	aA*	14,2	aA*	3,34	bA	6,29	dA
22	10,4	bA*	12,1	bA*	3,49	bA	5,98	dA	63	13,7	aB*	17,5	aA*	2,80	bA	6,03	dA

Continua

G	Grão integral				Grão polido				Grão integral				Grão polido				
	Safr 1		Safr 2		Safr 1		Safr 2		Safr 1		Safr 2		Safr 1		Safr 2		
23	11,8	bA*	12,1	bA*	3,81	bB	8,36	cA	64	9,51	bA*	12,3	bA*	3,46	bA	2,98	dA
24	16,0	aA*	11,2	bB*	3,78	bA	3,24	dA	65	12,8	bA*	11,0	bA*	4,28	bA	3,37	dA
25	12,4	bA*	11,5	bA*	3,55	bA	5,67	dA	66	12,9	bA*	13,5	aA*	5,16	aA	5,00	dA
26	13,2	aA*	12,9	aA*	3,30	bA	5,94	dA	67	12,1	bA*	12,1	bA <sup>ns</sup>	5,62	aB	9,43	cA
27	15,4	aA*	10,1	bB*	7,06	aA	3,97	dA	68	14,1	aA*	13,0	aA*	5,87	aA	5,04	dA
28	11,1	bB*	14,5	aA*	2,76	bA	4,85	dA	69	13,1	aA*	9,56	bB <sup>ns</sup>	6,22	aA	7,30	cA
29	13,2	aA*	16,4	aA*	4,43	bA	5,08	dA	70	13,8	aA*	9,92	bB*	4,51	bA	2,03	dA
30	9,23	bA*	10,9	bA*	4,55	bA	3,52	dA	71	12,1	bA*	10,5	bA*	4,40	bA	4,51	dA
31	13,3	aA*	12,6	aA*	4,57	bA	7,32	cA	72	14,7	aA*	12,3	bA*	4,58	bA	4,65	dA
32	12,8	bA*	15,1	aA*	5,95	aA	7,89	cA	73	13,3	aA*	13,6	aA*	4,86	bA	3,34	dA
33	10,9	bA*	10,4	bA*	4,66	bA	4,79	dA	74	12,9	bA*	13,6	aA*	3,32	bA	4,08	dA
34	10,8	bA*	9,87	bA*	4,52	bA	3,38	dA	75	14,2	aA*	10,9	bA*	4,49	bA	3,31	dA
35	11,0	bA*	14,2	aA*	3,56	bA	4,90	dA	76	15,5	aA*	10,8	bB*	6,78	aA	4,68	dA
36	13,3	aA*	10,1	bA*	3,33	bA	2,48	dA	77	16,1	aA*	11,0	bB*	4,50	bA	3,06	dA
37	15,5	aA*	13,7	aA*	10,0	aA	6,18	dB	78	11,2	bA*	9,50	bA*	3,31	bA	4,06	dA
38	13,4	aA*	11,6	bA*	7,03	aA	3,35	dB	79	12,2	bA*	11,8	bA*	6,65	aA	2,03	dB
39	13,5	aA*	11,4	bA <sup>ns</sup>	4,49	bB	12,0	bA	80	11,2	bA*	12,9	aA*	3,10	bA	3,04	dA
40	13,8	aA*	10,0	bB <sup>ns</sup>	2,75	bB	8,60	cA	81	15,0	aA*	10,5	bB*	5,93	aA	5,16	dA
41	8,55	bB*	14,0	aA*	2,21	bA	3,48	dA	82	11,1	bA*	12,8	aA <sup>ns</sup>	2,87	bB	11,0	cA

G: genótipo

É evidente a necessidade de melhoramento para aumentar o acúmulo de Fe no grão. Para isso, pode-se direcionar cruzamentos entre os genótipos de maior concentração de Fe, de modo a aumentar o acúmulo desse elemento nas gerações segregantes, como consequência de efeitos aditivos positivos. Um loco que controla acúmulo de Fe em grão integral foi detectado, e os alelos apresentam efeito aditivo (DU et al., 2013). Porém, além de aumentar o acúmulo de Fe, os melhoristas devem desenvolver estratégias para internalizar esse elemento no grão, para não ser perdido com o processo de polimento.

O ambiente de cultivo influenciou o acúmulo de Fe em grãos integrais e grãos polidos em ~25% e ~20% dos genótipos, respectivamente (Tabela 6). A influência do ambiente no acúmulo de minerais, foi previamente reportada (CHANDEL et al., 2010; DU et al., 2013; SUWARTO; NASRULLAH, 2011), e os autores sugerem que o ambiente pode influenciar a biodisponibilidade de Fe no solo, e conseqüentemente no acúmulo desse elemento no grão. O ambiente exerce considerável influência sobre o acúmulo de Fe, pois é uma característica complexa, controlada por muitos genes (CHANDEL et al., 2010). O baixo número de genótipos ( $\frac{1}{4}$ ) que teve o acúmulo de Fe influenciado pelo ambiente nesse estudo pode ser explicado pela similaridade dos ambientes, já que as áreas de cultivo eram próximas, compartilhando as características de solo, e diferindo apenas nas condições climáticas entre as safras. Em ambientes similares a concentração de micronutrientes de um determinado genótipo permanece constante (MAGANTI et al., 2020).

O polimento é uma etapa fundamental na pós-colheita de arroz para atender a demanda da maioria dos consumidores, que prefere o sabor e a textura do arroz branco, e o menor tempo de cozimento quando comparado com o grão integral. Além disso, esse processamento é necessário para reduzir o teor de óleo (presente no farelo) e minimizar o risco de ranço, aumentando a vida útil. O processo de polimento remove o farelo, que é constituído de germe/embrião e camadas de aleurona/pericarpo. Como as camadas externas são muito mais densas em minerais do que as partes internas ocorre um declínio substancial na concentração de minerais em grãos polidos (FITZGERALD et al., 2009; HANSEN et al., 2012).

De fato, o polimento é responsável pela maior perda de Fe no grão de arroz (MAGANTI et al., 2020), o que explica a redução significativa de Fe em

praticamente todos os genótipos após o polimento (Tabela 6). No entanto, a quantidade de Fe perdida com o polimento varia entre os genótipos, ou seja, enquanto alguns genótipos perdem  $4 \text{ mg kg}^{-1}$ , outros perdem até  $12 \text{ mg kg}^{-1}$ . Resultados similares foram encontrados por Hansen et al., (2012), que sugerem a possibilidade de seleção de genótipos com reduzida perda de Fe após polimento. A redução da concentração de Fe com o polimento pode variar de 16 a 97,4% (MAGANTI et al., 2020). A perda de Fe após polimento também foi influenciada pelo ambiente de cultivo, por exemplo, na primeira safra o genótipo 1 teve uma redução de Fe  $12,1 \text{ mg kg}^{-1}$  com polimento, enquanto na segunda safra, esse genótipo teve uma perda de  $7,53 \text{ mg kg}^{-1}$ . Esse perfil sugere que efeito do ambiente na localização do Fe nos grãos de arroz.

De modo similar ao observado para Fe, o acúmulo de Mn em grãos de arroz foi influenciado pela interação dos três fatores analisados, processamento, ambiente de cultivo e genótipo (Tabelas 5 e 7). Considerando a ingestão diária de arroz de 180 g por dia (CARRIJO et al., 2018), e a ingestão diária recomendada de Mn para adultos que é 2,3 mg por dia para homens e 1,8 mg dia para mulheres (IOM, 2001), o consumo de grão integral de todos os genótipos analisados é capaz de atender a demanda diária de Mn. Porém, se considerar o grão polido há redução significativa de Mn, e por isso, nem todos os genótipos conseguem suprir a necessidade diária.

Entre os genótipos estudados, a concentração de Mn variou de 13,62 a  $37,66 \text{ mg kg}^{-1}$  no grão integral e de 5,66 a  $26,3 \text{ mg kg}^{-1}$  no grão polido. Yao et al. (2020) verificaram que em arroz cultivado na China o acúmulo de Mn variou de 12,8 a  $74,9 \text{ mg kg}^{-1}$  em grão integral, e de 5,5 a  $45,1 \text{ mg kg}^{-1}$  em grãos polidos. Alguns genótipos cultivados na China apresentam acúmulo de Mn bem superior que aos genótipos cultivados no Brasil.

Para a maioria dos genótipos, a safra de cultivo influenciou significativamente na concentração de Mn (Tabela 7). Du et al. (2013) já haviam demonstrado que o acúmulo de Mn é fortemente influenciado pelo ambiente de cultivo (tipo de solo, fertilidade, pH e clima). Neste estudo o solo é bastante parecido, pois as áreas eram próximas, no entanto, o clima foi característico de cada safra, por isso, pode ter influenciado o crescimento e metabolismo da planta, e conseqüentemente a captação de elementos do solo (DU et al., 2013).

**Tabela 7.** Acúmulo de Mn (mg kg<sup>-1</sup>) em grãos de arroz integral e polido. Considerando grão integral, médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si. Considerando grão polido, médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si, \* e <sup>ns</sup> correspondem a significativo e não significativo, respectivamente, quando se compara grão integral com grão polido dentro de cada safra.

Grão integral					Grão polido				Grão integral					Grão Polido			
G	Safra1		Safra2		Safra1		Safra2		G	Safra1		Safra2		Safra1		Safra2	
1	21,7	cA*	22,4	bA*	8,91	bA	11,8	dA	42	24,4	bA*	21,1	bA <sup>ns</sup>	9,62	bB	20,8	bA
2	15,3	cA <sup>ns</sup>	19,0	bA*	10,8	aA	6,31	eB	43	36,6	aA*	26,8	aB*	11,8	aB	21,2	bA
3	20,2	cB*	29,0	aA*	10,8	aB	16,8	cA	44	18,2	cB*	28,8	aA*	9,46	bA	12,5	dA
4	22,9	cA*	23,5	bA*	10,4	aA	8,90	eA	45	21,4	cA*	13,6	bB*	11,5	aB	26,3	aA
5	17,8	cA*	21,8	bA*	8,75	bA	10,8	dA	46	19,2	cA*	22,9	bA*	8,48	bB	16,8	cA
6	15,3	cB*	25,6	aA <sup>ns</sup>	7,79	bB	25,6	aA	47	16,5	cB*	28,3	aA*	9,21	bA	10,5	dA
7	18,7	cB*	25,0	aA*	9,86	bA	12,3	dA	48	22,6	cA*	26,1	aA*	10,5	aA	10,2	eA
8	20,9	cA*	19,2	bA*	9,26	bA	10,2	eA	49	16,0	cB*	25,4	aA*	7,95	bA	10,2	eA
9	18,3	cB*	25,9	aA*	9,14	bA	9,09	eA	50	17,5	cA*	21,9	bA*	8,83	bA	8,19	eA
10	24,7	bA*	20,0	bA*	10,3	aA	10,7	dA	51	16,5	cB*	25,9	aA*	10,9	aA	10,9	dA
11	17,6	cA*	20,7	bA*	9,08	bA	10,8	dA	52	21,6	cA*	19,5	bA*	9,89	bA	10,6	dA
12	16,6	cA*	21,1	bA*	7,83	bA	6,59	eA	53	26,2	bA*	20,9	bA*	12,3	aA	8,64	eA
13	15,9	cA*	16,4	bA*	7,95	bA	7,92	eA	54	16,1	cA*	17,7	bA*	5,66	bA	5,71	eA
14	18,6	cA*	20,2	bA*	9,93	bA	8,37	eA	55	17,9	cA*	22,1	bA*	10,7	aA	12,0	dA
15	20,6	cA*	22,6	bA*	10,9	aA	8,54	eA	56	17,5	cB*	24,4	aA*	9,44	bA	11,3	dA
16	17,9	cA*	21,0	bA*	8,40	bB	13,2	dA	57	19,0	cA*	22,9	bA*	10,4	aA	11,0	dA
17	17,0	cA*	20,0	bA*	8,55	bA	8,72	eA	58	19,6	cA*	23,4	bA*	10,6	aA	10,0	eA
18	14,9	cA*	18,1	bA*	6,82	bA	7,53	eA	59	15,5	cA*	20,4	bA*	8,56	bA	8,93	eA
19	20,2	cA*	24,6	aA*	11,1	aA	11,9	dA	60	18,1	cA*	22,8	bA*	7,07	bA	7,77	eA
20	19,0	cB*	29,3	aA*	11,4	aA	8,79	eA	61	17,4	cB*	24,6	aA*	8,90	bB	16,1	cA
21	15,3	cB*	23,1	bA*	7,56	bB	12,0	dA	62	18,2	cB*	26,0	aA*	8,63	bA	12,6	dA
22	17,0	cB*	24,6	aA*	8,54	bA	12,8	dA	63	19,8	cB*	28,4	aA*	9,05	bA	10,3	eA

Continua

Grão integral					Grão polido				Grão integral					Grão polido			
G	Safra1		Safra2		Safra1		Safra2		G	Safra1		Safra2		Safra1		Safra2	
23	19,9	cB*	29,1	aA*	8,18	bB	15,1	cA	64	21,0	cA*	24,5	aA*	10,1	bA	9,16	eA
24	20,2	cA*	20,7	bA*	8,60	bA	10,2	eA	65	21,1	cA*	25,7	aA*	9,81	bA	9,34	eA
25	16,8	cB*	23,2	bA*	8,76	bB	13,8	dA	66	21,2	cB*	27,3	aA*	9,50	bA	10,1	eA
26	19,3	cB*	25,9	aA*	8,62	bB	15,0	cA	67	26,2	bA*	30,1	aA*	14,6	aB	22,2	bA
27	19,6	cA*	20,3	bA*	11,7	aA	9,92	eA	68	35,9	aA*	29,6	aB*	14,8	aA	12,7	dA
28	17,3	cB*	26,1	aA*	7,72	bB	12,8	dA	69	24,1	bA*	20,9	bA <sup>ns</sup>	11,8	aB	16,7	cA
29	23,2	cA*	26,9	aA*	8,22	bA	10,1	eA	70	19,6	cA*	24,1	aA*	10,3	aA	8,73	eA
30	17,4	cA*	23,1	bA*	8,32	bB	13,4	dA	71	25,5	bA*	24,9	aA*	11,6	aA	9,61	eA
31	26,7	bA*	31,0	aA*	13,2	aA	16,3	cA	72	22,8	cA*	25,4	aA*	10,1	bA	11,7	dA
32	19,1	cB*	25,8	aA*	9,42	bA	13,4	dA	73	22,6	cA*	28,3	aA*	10,3	aA	9,47	eA
33	24,9	bA*	27,7	aA*	11,9	aA	12,8	dA	74	18,3	cB*	28,4	aA*	8,01	bA	9,73	eA
34	24,3	bA*	24,9	aA*	13,7	aA	11,9	dA	75	27,0	bA*	27,0	aA*	11,9	aA	12,3	dA
35	21,9	cA*	24,3	aA*	10,3	aA	10,6	dA	76	21,3	cB*	28,1	aA*	8,56	bA	11,2	dA
36	20,0	cB*	28,3	aA*	9,47	bA	10,7	dA	77	26,0	bA*	21,0	bA*	9,76	bA	9,99	eA
37	22,4	cB*	34,9	aA*	11,7	aA	15,8	cA	78	16,8	cB*	31,0	aA*	7,18	bB	13,9	dA
38	25,5	bA*	24,4	aA*	13,2	aA	10,4	eA	79	37,7	aA*	23,4	bB*	15,9	aA	6,93	eB
39	24,0	bA*	27,6	aA <sup>ns</sup>	10,7	aB	26,3	aA	80	20,1	cB*	30,8	aA*	9,49	bA	10,1	eA
40	17,2	cA*	19,9	bA <sup>ns</sup>	8,42	bB	16,4	cA	81	32,2	aA*	25,5	aB*	13,9	aA	12,6	dA
41	17,6	cA*	21,2	bA*	6,79	bA	7,64	eA	82	20,9	cA*	22,5	bA <sup>ns</sup>	9,17	bB	20,0	bA

G: genótipo

O polimento ocasiona uma redução significativa na concentração de Mn, e a quantidade reduzida varia de acordo com o genótipo, ou seja, alguns genótipos perdem mais Mn que outros. A safra também influenciou na quantidade de Mn perdida. A redução na concentração de Mn devido ao polimento também foi demonstrada recentemente por Yao et al. (2020). Ao analisar 446 amostras de arroz, coletadas em diferentes campos de produção na China, os autores verificaram que o polimento ocasionou uma redução média de mais de 50% na concentração desse elemento. Os autores discutem que o Mn, assim como outros elementos, se acumula nas camadas mais externas do grão, que são removidas durante o polimento e formam o farelo. Em um estudo desenvolvido com genótipos de arroz com grão pigmentado cultivado na Índia, foi demonstrado que esse acúmulo de Mn nas camadas externas é uma característica da espécie, o que se mantém nos diferentes genótipos (REDDY et al., 2017).

A concentração de Cu em grão de arroz foi afetada pela interação genótipo x ambiente de cultivo e processamento x ambiente de cultivo (Tabela 5 e 8). Considerando o consumo médio diário de arroz de ~180 g por dia (CARRIJO et al., 2018) e a ingestão diária recomendada de Cu para homens e mulheres adultos que é 0,9 mg por dia (IOM, 2001), apenas alguns genótipos, aqueles com concentração média de ~5 mg kg<sup>-1</sup> de Cu, conseguem atender a demanda diária desse elemento. Por isso, o aumento no acúmulo de Cu pode ser considerado nos programas de melhoramento.

O efeito do genótipo no acúmulo de Cu já havia sido detectado por Yan et al. (2006). A concentração de Cu observada nos genótipos de maior acúmulo (Tabela 8) foi similar ao encontrado por Monteiro et al., (2020), que também avaliaram genótipos de arroz cultivados no Rio Grande do Sul. Porém, os autores também encontraram genótipos com concentração bem inferior (0,390mg kg<sup>-1</sup>) às observadas no presente estudo. Pinson et al. (2015), avaliando genótipos de diferentes regiões do mundo também verificaram que a concentração máxima de Cu foi de 5,39 mg kg<sup>-1</sup> em grãos de arroz de cultivo irrigado.

O polimento ocasionou uma redução significativa na concentração de Cu no grão (Tabela 8). A remoção de Cu com polimento já havia sido demonstrada por Yao et al. (2020), que verificaram uma redução de ~30% com a remoção das camadas externas do grão (farelo). E os autores discutem que o acúmulo de Cu

não é limitado às camadas mais externas, mas gradualmente difundida na camada interna, se estendendo para o endosperma, com distribuição relativamente uniforme no endosperma.

Para o elemento Zn a concentração nos grãos de arroz estudados foi influenciada pela interação genótipo x ambiente de cultivo e processamento x ambiente de cultivo (Tabela 5 e 8). Verificando que o consumo médio diário de grãos de arroz é 180 g (CARRIJO et al., 2018) e a ingestão diária de Zn para adultos é de 11 mg para homens e 8mg para mulheres (IOM, 2001), nota-se que nenhum dos genótipos avaliados, tanto no grão integral quanto no grão polido, atingem a demanda necessária por dia. Com isso, a necessidade de elevar a concentração de Zn é de suma importância para os programas de melhoramento.

Há variação genotípica para a distribuição de micronutrientes através das camadas de grãos de arroz, incluindo Zn (GREGORIO et al., 2000). Para os valores de Zn, que variaram de 11,7 até 27,54 mg kg<sup>-1</sup> (Tabela 8), foi visto que os genótipos obtiveram resultados parecidos aos encontrados por Maganti et al. (2020), que avaliaram 159 genótipos de arroz tradicionalmente cultivados na Índia. Os autores verificaram que os valores variaram de 14,6 até 39,2 mg kg<sup>-1</sup> numa safra e 14,5 até 35,5 mg kg<sup>-1</sup> em outra safra. Em outras pesquisas também foram encontrados valores próximos, mas os genótipos demonstraram valores extremos, de 0,85 mg kg<sup>-1</sup> a 195, 3 mg kg<sup>-1</sup> (ROY; SHARMA, 2014).

O elemento Zn é localizado ao longo de todo o endosperma. No entanto, a estimativa da quantidade de Zn presente no arroz integral serve como indicador eficiente da quantidade do elemento no arroz polido (MAGANTI et al., 2020). No processo de polimento ocorre uma perda significativa de concentração, entorno de 20%, de Zn no grão (Tabela 8). Reduções similares foram observadas por Hansen et al. (2009), com uma diminuição de 25-30% da concentração de Zn devido a retirada da camada de aleurona. Em uma coleção de 485 acessos, valores de 20 mg kg<sup>-1</sup> e 25 mg kg<sup>-1</sup> foram relatados em grãos de arroz polido e integral, respectivamente (PRADHAN et al., 2020a). Resultados semelhantes foram relatados, variando de 18,6 mg kg<sup>-1</sup> a 25,5 mg kg<sup>-1</sup> (KUMAR et al., 2017).

Para o elemento Se também foi verificado que a concentração nos grãos de arroz sofreu influência pela interação genótipo x ambiente de cultivo e processamento x ambiente de cultivo (Tabela 5 e 8). Sabe-se, como mencionado

anteriormente, que o consumo médio diário de grãos de arroz é 180 g (CARRIJO et al., 2018), e a ingestão diária de Se para homens e mulheres é de 0,055 mg diariamente (IOM, 2001), portanto somente alguns genótipos, os que apresentam uma concentração média de  $\sim 0,250 \text{ mg kg}^{-1}$  de Se, atendem a necessidade diária desse micronutriente.

Existe variação na absorção e acúmulo de Se nos diferentes genótipos de arroz (TANG et al., 2017). Os valores observados de concentração de Se nos genótipos (Tabela 8) foi similar ao estudo feito por Zhang et al. (2019), que avaliaram 80 genótipos cultivados na China. Porém, no geral, os valores encontrados por Zhang et al. (2019) foram inferiores quando comparados aos valores do presente estudo. As cultivares brasileiras de arroz cultivadas em diferentes localidades do Rio Grande do Sul apresentaram concentrações de Se semelhantes às aqui identificadas (MONTEIRO et al., 2020). Os genótipos com maior concentração de Se identificados por Monteiro et al. (2020) ainda são menores no acúmulo de Se quando comparados aos valores encontrados neste estudo em uma das safras.

Uma redução significativa na concentração de Se devido ao processo de polimento foi detectada em apenas uma safra (Tabela 8). A ocorrência de perda acentuada de Se é conhecida, e uma redução de 29% no teor de Se após o polimento foi relatada anteriormente (YAO et al., 2020).

É importante notar a forte influência da safra na concentração de Se observada neste estudo (Tabela 8). A biodisponibilidade de Se no solo depende da quantidade total deste elemento e da forma química. O selênio é encontrado no solo nas formas de selenato ( $\text{Se}^{6+}$ ), selenito ( $\text{Se}^{4+}$ ), selênio elementar ( $\text{Se}^0$ ) e seleneto ( $\text{Se}^{2-}$ ). O pH e o potencial redox do solo (Eh), além do teor de argila e matéria orgânica são os principais fatores que controlam as formas químicas do Se. O selenito pode ocorrer em solos ácidos ou neutros, sendo sorvida em oxihidróxidos. Por outro lado, o selenato ocorre em solos alcalinos e possui alta mobilidade (revisado por LOPES et al. 2017). Embora os solos utilizados nas duas safras sejam semelhantes, como as áreas eram próximas, as pequenas diferenças no solo poderiam explicar as mudanças na concentração de Se observadas entre as safras. Além disso, a condição climática de cada época de colheita pode ter influenciado o metabolismo das plantas, afetando a absorção e

translocação de Se. Assim, esses achados destacam a complexidade do processo de biofortificação de Se (agronômico ou genético).

**Tabela 8.** Teor médio de cobre (Cu), zinco (Zn) e selênio (Se) ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) em grãos de arroz integral e polido de diferentes genótipos de arroz. A interação entre genótipo x ambiente de cultivo é mostrada no topo. As médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e a mesma letra minúscula na coluna não diferem. A interação entre processamento x ambiente de cultivo é mostrada na parte inferior. As médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e a mesma letra minúscula na coluna não diferem. As médias foram analisadas pelo teste de Scott-Knott ( $p \leq 0,05$ ).

Interação entre os genótipos x safra						
Gen	Cu		Zn		Se	
	Safra 1	Safra 2	Safra 1	Safra 2	Safra 1	Safra 2
1	3,41 cA	1,33 eB	18,1 dA	17,2 dA	0,121 bA	0,095 aA
2	3,48 cA	1,28 eB	27,4 aA	19,7 cB	0,223 aA	0,081 aB
3	3,18 cA	2,36 dA	15,4 eA	16,8 dA	0,175 aA	0,071 aB
4	3,25 cA	1,88 dB	18,2 dA	13,6 fB	0,143 bA	0,081 aB
5	3,22 cA	1,64 eB	15,1 eA	14,1 fA	0,175 aA	0,083 aB
6	2,49 cA	3,22 cA	15,4 eB	20,1 cA	0,151 bA	0,030 aB
7	3,50 cA	2,29 dB	19,8 cA	20,5 cA	0,138 bA	0,038 aB
8	3,27 cA	1,25 eB	17,6 dA	14,4 fB	0,133 bA	0,056 aB
9	2,78 cA	1,68 eB	22,0 cA	15,7 eB	0,153 bA	0,090 aB
10	3,71 bA	1,30 eB	16,1 eA	11,7 fB	0,188 aA	0,073 aB
11	4,28 bA	1,27 eB	19,2 cA	16,9 dA	0,105 bA	0,093 aA
12	3,02 cA	1,87 dB	15,1 eA	16,6 dA	0,151 bA	0,088 aB
13	2,76 cA	1,19 eB	17,8 dA	19,7 cA	0,188 aA	0,106 aB
14	3,47 cA	1,70 eB	15,1 eA	16,4 eA	0,125 bA	0,125 aA
15	3,19 cA	1,19 eB	19,0 cA	16,8 dA	0,188 aA	0,131 aA
16	4,17 bA	1,17 eB	17,1 dA	14,5 fA	0,136 bA	0,111 aA
17	3,63 bA	1,66 eB	17,1 dB	22,3 cA	0,165 bA	0,041 aB
18	2,61 cA	1,45 eB	14,7 eB	18,8 dA	0,128 bA	0,039 aB
19	3,66 bA	2,38 dB	18,5 dA	19,0 dA	0,166 bA	0,037 aB
20	3,00 cA	3,32 cA	19,4 cA	20,8 cA	0,163 bA	0,031 aB
21	3,04 cA	2,21 dA	15,1 eA	16,0 eA	0,123 bA	0,037 aB
22	2,09 cA	1,62 eA	13,9 eA	12,9 fA	0,131 bA	0,039 aB
23	3,00 cA	2,15 dA	15,6 eB	18,5 dA	0,195 aA	0,041 aB
24	3,33 cA	2,00 dB	17,3 dA	15,5 eA	0,148 bA	0,034 aB
25	2,73 cA	1,57 eB	16,7 eA	18,0 dA	0,145 bA	0,027 aB
26	3,34 cA	2,01 dB	16,1 eA	18,6 dA	0,173 aA	0,033 aB
27	3,98 bA	1,18 eB	19,3 cA	15,8 eB	0,161 bA	0,040 aB
28	3,12 cA	1,76 eB	19,6 cA	20,3 cA	0,190 aA	0,033 aB
29	4,13 bA	1,74 eB	26,3 aA	21,5 cB	0,150 bA	0,053 aB
30	2,60 cA	1,96 dA	18,1 dB	22,1 cA	0,147 bA	0,049 aB
31	3,88 bA	2,48 dB	20,2 cA	22,1 cA	0,140 bA	0,045 aB

Continua

Interação entre os genótipos x safra						
Gen	Cu		Zn		Se	
	Safra 1	Safra 2	Safra 1	Safra 2	Safra 1	Safra 2
32	3,45 cA	2,97 cA	20,3 cA	22,2 cA	0,186 aA	0,038 aB
33	3,84 bA	2,39 dB	18,9 cA	15,4 eB	0,208 aA	0,046 aB
34	3,56 cA	2,44 dB	19,2 cA	16,7 dA	0,196 aA	0,050 aB
35	3,73 bA	2,48 dB	17,7 dA	13,4 fB	0,181 aA	0,052 aB
36	3,09 cA	1,34 eB	17,4 dA	16,2 eA	0,151 bA	0,046 aB
37	3,71 bA	2,04 dB	23,4 bA	22,0 cA	0,180 aA	0,056 aB
38	4,81 aA	2,30 dB	21,1 cA	19,0 dA	0,233 aA	0,036 aB
39	5,44 aA	5,36 aA	24,3 bA	22,6 cA	0,170 aA	0,029 aB
40	2,94 cA	1,63 eB	15,5 eA	16,4 eA	0,153 bA	0,035 aB
41	2,64 cA	1,59 eB	15,7 eA	16,1 eA	0,131 bA	0,043 aB
42	3,93 bB	5,43 aA	17,2 dA	17,9 dA	0,203 aA	0,046 aB
43	4,12 bA	2,83 cB	23,8 bA	26,2 aA	0,198 aA	0,040 aB
44	2,81 cA	1,65 eB	18,4 dA	17,9 dA	0,170 aA	0,043 aB
45	3,12 cA	1,54 eB	18,6 dA	18,2 dA	0,203 aA	0,036 aB
46	3,35 cA	3,45 cA	16,5 eA	16,8 dA	0,148 bA	0,035 aB
47	3,19 cA	1,64 eB	16,3 eB	19,1 dA	0,103 bA	0,055 aA
48	3,69 bA	1,93 dB	15,9 eA	16,1 eA	0,128 bA	0,060 aB
49	3,43 cA	2,54 dA	14,3 eA	16,3 eA	0,096 bA	0,053 aA
50	2,80 cA	1,52 eB	17,1 dA	15,4 eA	0,155 bA	0,045 aB
51	2,87 cA	2,08 dA	16,6 eA	17,2 dA	0,188 aA	0,043 aB
52	2,85 cA	2,35 dA	18,4 dA	17,0 dA	0,179 aA	0,033 aB
53	4,08 bA	2,35 dB	18,0 dA	18,8 dA	0,218 aA	0,043 aB
54	3,55 cA	1,36 eB	17,1 dB	20,6 cA	0,161 bA	0,059 aB
55	3,77 bA	2,28 dB	17,3 dA	17,8 dA	0,146 bA	0,043 aB
56	2,66 cA	2,45 dA	16,2 eA	16,0 eA	0,143 bA	0,033 aB
57	3,77 bA	2,06 dB	17,6 dA	15,6 eA	0,131 bA	0,035 aB
58	3,09 cA	1,87 dB	16,3 eA	14,9 eA	0,125 bA	0,030 aB
59	2,97 cA	1,67 eB	18,7 dA	18,7 dA	0,199 aA	0,032 aB
60	2,25 cA	1,52 eA	15,8 eB	21,2 cA	0,208 aA	0,054 aB
61	2,66 cA	2,03 dA	16,6 eA	17,5 dA	0,180 aA	0,038 aB
62	3,70 bA	1,64 eB	17,3 dA	16,4 eA	0,150 bA	0,055 aB
63	3,16 cA	3,63 cA	17,5 dA	18,4 dA	0,210 aA	0,038 aB
64	2,56 cA	2,08 dA	19,2 cB	23,1 cA	0,086 bA	0,043 aA
65	2,91 cA	1,47 eB	17,2 dA	16,8 dA	0,131 bA	0,035 aB
66	3,85 bA	2,83 cA	18,5 dA	16,3 eA	0,263 aA	0,045 aB
67	4,03 bA	4,30 bA	20,8 cB	24,6 bA	0,241 aA	0,031 aB
68	5,26 aA	3,03 cB	19,8 cA	16,3 eB	0,258 aA	0,028 aB
69	4,89 aA	2,96 cB	18,7 dA	15,9 eB	0,193 aA	0,037 aB
70	4,55 aA	2,76 cB	19,8 cA	15,0 eB	0,187 aA	0,059 aB
71	4,21 bA	2,96 cB	21,7 cA	18,4 dB	0,235 aA	0,028 aB
72	4,46 aA	4,40 bA	19,9 cB	23,9 bA	0,128 bA	0,051 aB
73	4,07 bA	3,89 cA	19,5 cB	22,3 cA	0,186 aA	0,043 aB

Continua

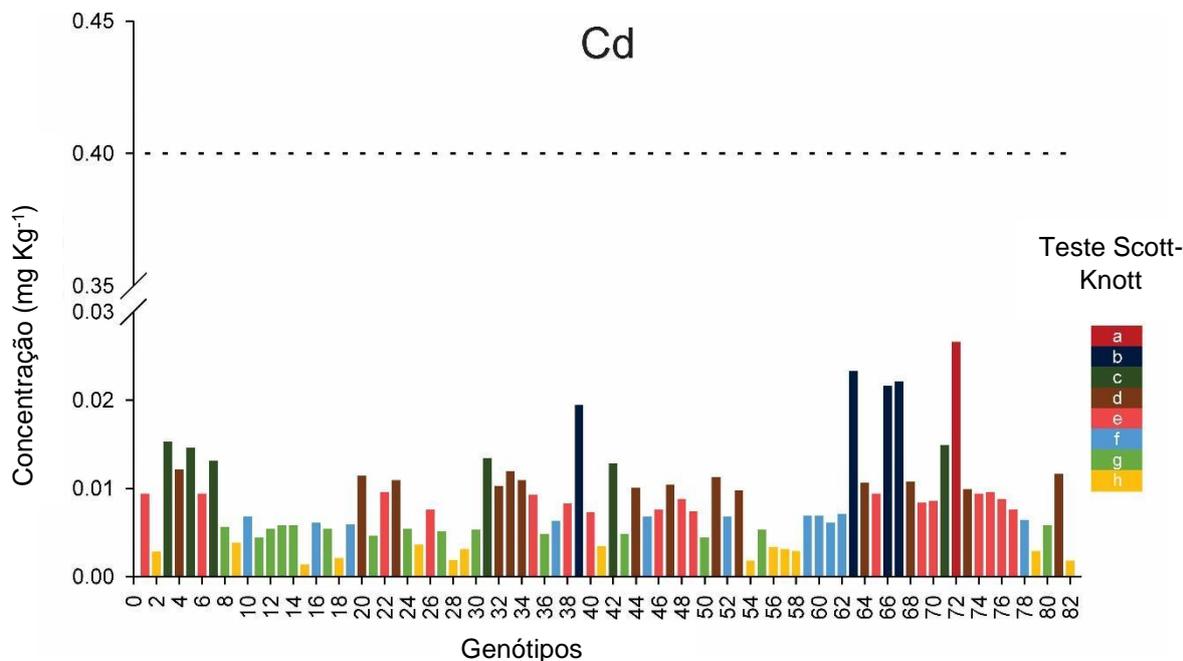
Interação entre os genótipos x safra						
Gen	Cu		Zn		Se	
	Safra 1	Safra 2	Safra 1	Safra 2	Safra 1	Safra 2
74	3,20 cA	2,24 dA	17,2 dA	16,6 dA	0,108 bA	0,034 aB
75	4,50 aA	2,86 cB	18,6 dA	17,3 dA	0,183 aA	0,043 aB
76	3,11 cA	2,42 dA	15,7 eA	14,9 eA	0,173 aA	0,049 aB
77	4,82 aA	3,32 cB	19,8 cA	22,3 cA	0,168 aA	0,042 aB
78	2,64 cA	2,29 dA	17,1 dA	17,2 dA	0,133 bA	0,038 aB
79	4,23 bA	1,31 eB	19,9 cA	15,1 eB	0,180 aA	0,052 aB
80	2,61 cA	1,56 eB	19,8 cA	18,2 dA	0,165 bA	0,054 aB
81	4,69 aA	2,04 dB	21,6 cA	17,4 dB	0,216 aA	0,039 aB
82	3,44 cA	3,43 cA	19,4 cB	27,1 aA	0,143 bA	0,036 aB
Interação entre processamento x safra						
	Safra 1	Safra 2	Safra 1	Safra 2	Safra 1	Safra 2
Grão integral	4,59 aA	2,51 aB	20,5 aA	19,4 aB	0,178 aA	0,053 aB
Grão polido	2,48 bA	1,96 bB	16,1 bB	16,8 bA	0,155 bA	0,048 aB

### 3.3.2 Acúmulo de elementos tóxicos

Os genótipos avaliados apresentaram acúmulo de Cd abaixo dos limites permitidos no Brasil, inclusive os genótipos com maior acúmulo tiveram concentração aproximadamente 10 vezes menor que o permitido (Figura 5). Recentemente, um estudo desenvolvido demonstrou que o acúmulo de Cd em grãos integrais de alguns genótipos cultivados no Rio Grande do Sul variou de 0,007 a 0,044 mg kg<sup>-1</sup> (KATO et al., 2019), valores similares aos encontrados nesse estudo. Poletti et al. (2014), analisando amostras cultivadas no Rio Grande do Sul, também encontraram resultados similares, com acúmulo variando de 0,012 a 0,027 mg kg<sup>-1</sup> em grão integral e 0,015 a 0,023 mg kg<sup>-1</sup> em grão polido. Esses resultados indicam que o acúmulo de Cd não é um problema para o arroz cultivado no Sul do Brasil, situação diferente da enfrentada em países asiáticos, onde ocorre a contaminação de Cd via consumo de arroz (revisado por Bolan et al., 2013). No arroz, a absorção de Cd é mediada por *OsNramp1*, *OsNramp5* e *OsCd1*. Uma vez absorvido, *OsHMA3* envia Cd para o vacúolo das células da raiz, reduzindo a quantidade de Cd no xilema, *OsHMA2*, *OsCCX2* e *CAL1* regulam o transporte de Cd no xilema (CHEN et al., 2019a).

O acúmulo de Cd em grãos de arroz não foi afetado significativamente pelo processo de polimento (Tabela 5), diferente do que normalmente é

observado para alguns micronutrientes como Fe (MAGANTI et al., 2020), e também para elementos tóxicos como As (YIM et al., 2017). Esse comportamento sugere que o Cd é acumulado nas camadas mais internas do grão, como reportado previamente por Yao et al. (2020).

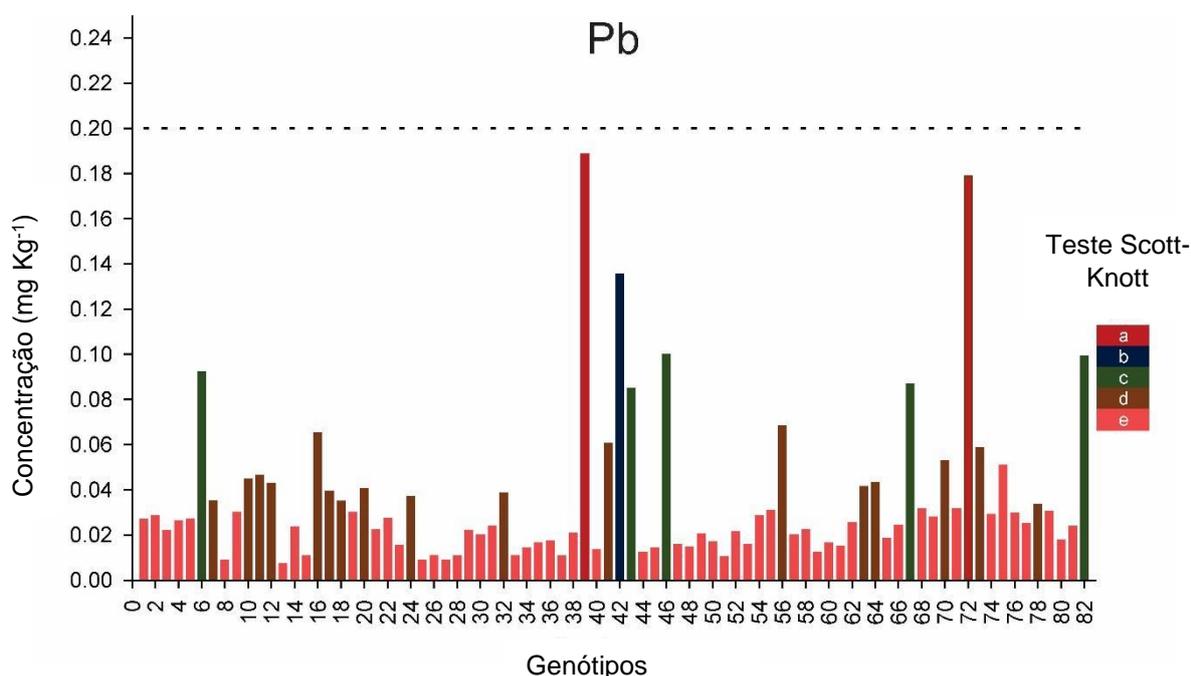


**Figura 5.** Acúmulo médio de cádmio (Cd) (mg kg<sup>-1</sup>) em grãos de arroz integral e polido de diferentes genótipos. Médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ( $p \leq 0,05$ ). A linha pontilhada representa o limite máximo de Cd permitido em arroz no Brasil (ANVISA, 2013).

O conteúdo de Pb em todos os genótipos de arroz avaliados ficou abaixo do limite permitido no Brasil (Figura 6). Entretanto, alguns genótipos apresentaram maior acúmulo (principalmente os genótipos 39 – Epagri 109 e 72 – SCS 117 CL), próximo ao limite. Por isso, é importante manter estudos de monitoramento para garantir a produção de arroz seguro. O acúmulo de Pb está associado à solubilidade desse elemento no solo, parte do Pb<sup>2+</sup> é adsorvido e imobilizado na superfície radicular através da ligação a grupos carboxílicos de ácidos urônicos e outros polissacarídeos de células rizodérmicas (revisado por Pereira et al., 2019). Da mesma forma que para o Cd, o conteúdo de Pb não foi afetado pelo processamento (Tabela 5), sugerindo que esse elemento também é internalizado no grão, não sendo removido e/ou reduzido através da remoção das camadas externas do grão.

No Rio Grande do Sul foi verificado que no grão integral o acúmulo de Pb variou de 0,042 a 0,150 mg kg<sup>-1</sup> e no grão polido a concentração de Pb foi de 0,036 a 0,109 mg kg<sup>-1</sup> (POLETTI et al., 2014), concordando com os valores encontrados no presente estudo. Resultados similares também foram aos verificados por Monteiro et al. (2020), que observaram que a concentração de Pb variou de < 0,005 a 0,046 mg kg<sup>-1</sup>. Com isso, o consumo de arroz cultivado no Rio Grande do Sul não representa risco para os consumidores quando se considera acúmulo de Pb.

Como esperado, o processamento (polimento) apresentou efeito significativo sobre o acúmulo de As em grãos (Tabela 5, Figura 7), reduzindo a concentração desse elemento nos grãos polidos. O processo de polimento com remoção de 10% de farelo levou a redução de 61-66% do As total do grão (NAITO et al., 2015). No entanto, no presente estudo verificou-se que a redução de As ocasionada pelo processo de polimento foi bem menor, média de ~12%.

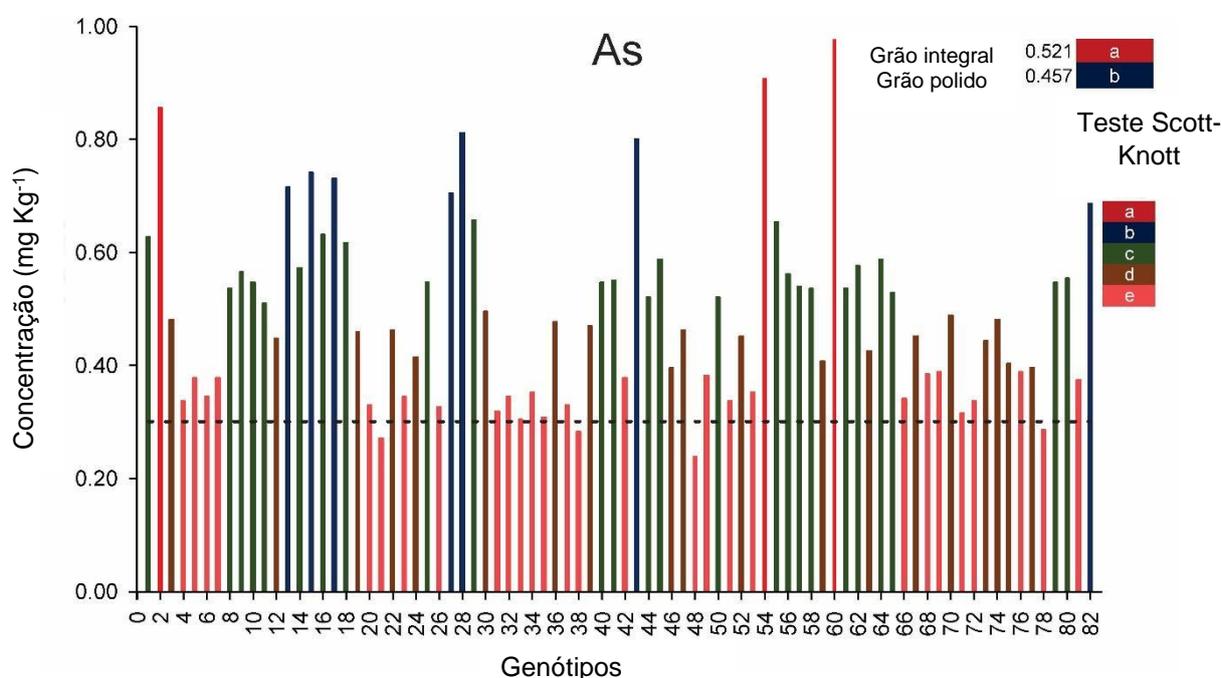


**Figura 6.** Acúmulo médio de chumbo (Pb) (mg kg<sup>-1</sup>) em grãos de arroz integral e polido de diferentes genótipos. Médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ( $p \leq 0,05$ ). A linha pontilhada representa o limite máximo de Pb permitido em arroz no Brasil (ANVISA, 2013).

A grande maioria dos genótipos estudados apresentou acúmulo de As acima do limite permitido no Brasil, exceto para os genótipos 21 (BRS Fronteira),

38 (Epagri 108), 48 (IRGA 424CL) e 78 (Selenio), sendo que em alguns genótipos (ex.: 54 - Koshihikari; 60 - Nowrin Mochi) a concentração foi mais que três vezes o limite (Figura 7). Índícios da presença de As em arroz brasileiro já havia sido reportado (FÃO et al., 2021; KATO et al., 2019; MONTEIRO et al., 2020). A maior concentração de As pode ser explicada pelo sistema de cultivo irrigado (solo em anaerobiose), que permite maior biodisponibilidade do elemento no solo (ISLAM et al., 2016). Isso acontece porque As(V), a forma oxidada de As inorgânico é reduzida a As(III), que é captado em maior quantidade pela planta de arroz.

O sistema de cultivo irrigado e a constituição genética do arroz favorecem o acúmulo de As nos grãos de arroz, causando de 10 a 20 vezes mais acúmulo de As do que a cevada e o trigo (revisado por Liao et al., 2018). Devido à semelhança com  $\text{PO}_4^{3-}$  o AsV é absorvido pelas raízes do arroz através dos mesmos transportadores (como *OsPHT1; 1* e *OsPHT1; 8*), enquanto as espécies AsIII e As metilado são absorvidas pelas raízes através do sistema de transporte de ácido silícico utilizando os transportadores *OsLsi1* e *OsLsi2* (revisado por Lange et al., 2020).



**Figura 7.** Acúmulo de arsênio (As) (mg kg<sup>-1</sup>) em grãos de arroz integral e polido de diferentes genótipos. Médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ( $p \leq 0,05$ ). A linha pontilhada representa o limite máximo de As permitido em arroz no Brasil (ANVISA, 2013).

Esse perfil de acúmulo de As observado acende um sinal de alerta, e aponta a necessidade de mais esforços no desenvolvimento de novos genótipos com menor captação e acúmulo de As, e no aprimoramento das práticas de manejo visando a menor disponibilização desse elemento no solo. O melhoramento para menor acúmulo de As é possível, pois há bastante variabilidade genética para acúmulo e especiação de As (ISLAM et al., 2016; PINSON et al., 2015) e a herdabilidade dessa característica é de 0,57 (PINSON et al., 2015). Considerando o manejo da cultura, tem sido reportadas práticas para reduzir o acúmulo desse elemento no grão (ISLAM et al., 2016).

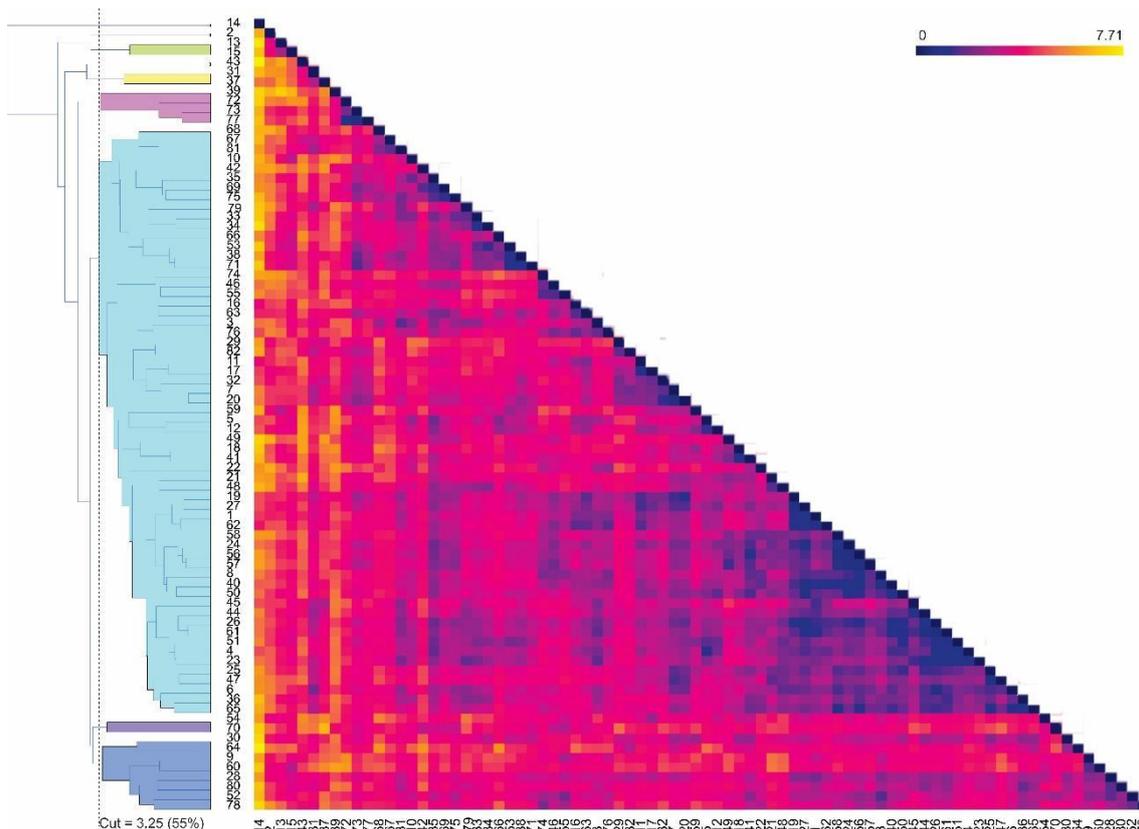
Deve-se evitar que o Brasil entre na lista dos países que enfrentam problemas com contaminação de As a partir do consumo de arroz, como é o caso dos países asiáticos (HASSAN et al., 2017). Em Bangladesh, por exemplo, foi detectado amostras de arroz com concentração de As de 1,83 mg kg<sup>-1</sup> (MEHARG; RAHMAN, 2003). Ainda considerando a situação dos países asiáticos, um estudo desenvolvido na Índia demonstrou que o consumo de arroz com mais de 0,200 mg kg<sup>-1</sup> de As leva a efeitos genotóxicos, com frequência elevada de micronúcleos de células uroteliais (BANERJEE et al., 2013).

### **3.3.3 Variabilidade genética**

Aumentar o acúmulo de minerais e reduzir a concentração de elementos tóxicos é um dos objetivos dos programas de melhoramento de arroz. A primeira etapa para iniciar um programa de melhoramento é rastrear o germoplasma disponível para detectar variabilidade genética para a característica de interesse, para uso em cruzamentos, estudos genéticos e desenvolvimento de marcadores moleculares (ROY; SHARMA, 2014).

Quando se considera todos os elementos, verifica-se que há pouca variabilidade genética dentro da coleção estudada. A maioria dos acessos tem uma pequena distância genética, indicando que os alelos envolvidos na captação, transporte e acúmulo desses elementos, são muito similares dentre os genótipos (Figura 8). Com isso, a maioria dos genótipos foi alocada no mesmo grupo (azul claro, com 61 genótipos). O segundo maior grupo (azul escuro) abrigou 8 genótipos. O terceiro maior grupo (roxo claro) é composto de quatro

genótipos desenvolvidos pela mesma empresa. Três grupos foram formados por apenas dois genótipos cada, sendo que dois grupos apresentam genótipos desenvolvidos pela mesma empresa (verde e amarelo). Por fim, os genótipos BRS A701CL (14), Arbório (2) e IRAT 162 (43) ficaram isolados, o que demonstra a maior distância desses genótipos em relação aos demais quando se considera acúmulo de elementos traço.



**Figura 8.** Heatmap demonstrando a distância Euclidiana e o agrupamento hierárquico usando métodos de grupos pares não ponderados com média aritmética (UPGMA) nos genótipos de arroz considerando o acúmulo de Fe, Mn, Cu, Zn, Se, As, Cd e Pb em grãos. O ponto de corte (3,25/55%) foi determinado através da média + K (1,25) x DP.

Dentre os estudos que analisaram variabilidade genética para acúmulo de diferentes elementos em grãos de arroz destaca-se o desenvolvido por Pinson et al, (2015). Nesse estudo, os autores utilizaram 1736 acessos de arroz, de origem genética e geográfica diferentes. Para facilitar a discussão, será considerada a variabilidade para Fe e Zn. Os autores verificaram que o acúmulo de Fe em grãos integrais variou de 1,55 a 16,58 mg kg<sup>-1</sup>, valores similares aos encontrados em nosso estudo. Já para o Zn, Pinson et al. (2015) detectaram

maior variação que a observada no presente estudo, com valores variando de 15,72 a 65,01 mg kg<sup>-1</sup>. Em outra coleção de arroz com 159 acessos de variedades crioulas indígenas, parentes selvagens e genótipos altamente produtivos, foi verificado que em grãos polidos, o acúmulo de Fe variou de 6,90 a 22,3 mg kg<sup>-1</sup>, e o conteúdo de Zn ficou entre 14,5 a 35,3 mg kg<sup>-1</sup> (MAGANTI et al., 2020). Os valores máximos estão um pouco acima dos encontrados no presente estudo. Ao analisar uma coleção com 84 variedade crioulas de arroz, foi observado que o acúmulo de Fe variou de 0,25, 34,8 até 65,4 mg kg<sup>-1</sup>, e para o Zn, a variação foi ainda maior, com genótipos variando de 0,85, 138,6 até 195,3 mg kg<sup>-1</sup> (ROY; SHARMA, 2014). A variação encontrada pelos autores é muito maior da observada na presente pesquisa e nos trabalhos desenvolvidos por outros autores (MAGANTI et al., 2020; PINSON et al., 2015). Esse comparativo demonstra a importância dos estudos de caracterização de genótipos, evidenciando que a maioria dos acessos tem menor variabilidade para acúmulo de elementos traço, mas ainda há variabilidade disponível para ser incluída em programas de melhoramento.

Outra informação importante apresentada por Pinson et al. (2015) é que uma grande parte da variação observada é de causa genética, com herdabilidade de 0,47 para Fe, 0,50 para Zn, 0,58 para Mn, 0,46 para Cu, 0,57 para As e 0,24 para Cd. Considerando a presença de variabilidade genética e os valores de herdabilidade verifica-se que é possível fazer melhoramento genético para ajustar o acúmulo da maioria dos elementos traço nos grãos de arroz.

### **3.3.4 Correlação entre elementos essenciais e elementos tóxicos**

Nos grãos integrais o acúmulo de Cd apresentou correlação positiva moderada com o acúmulo de Mn e correlação negativa fraca com o acúmulo de Se (Tabela 9). O acúmulo de As apresentou correlação negativa moderada com o acúmulo de Mn e correlação positiva moderada com o acúmulo de Se. Não foram detectadas correlações entre Pb e acúmulo de minerais essenciais. Nos grãos polidos, o acúmulo de Cd teve uma correlação positiva fraca com o acúmulo de Mn (Tabela 9). O acúmulo de Pb teve uma correlação positiva moderada com o acúmulo de Fe e Mn. O acúmulo de As apresentou correlação positiva fraca com o acúmulo de Cu e Se. Com base nesses resultados, sugere-

se que, no processo de melhoramento visando a biofortificação de cultivares de arroz, o teor de elementos tóxicos seja monitorado.

**Tabela 9.** Correlação de Pearson entre Cd, Pb, As e Fe, Mn, Cu, Zn, Se nos grãos dos genótipos de arroz.

Grão integral					
	Fe	Mn	Cu	Zn	Se
Cd	0,053 <sup>ns</sup>	0,426 <sup>**</sup>	0,172 <sup>ns</sup>	0,033 <sup>ns</sup>	-0,224 <sup>*</sup>
Pb	-0,044 <sup>ns</sup>	0,077 <sup>ns</sup>	0,180 <sup>ns</sup>	-0,099 <sup>ns</sup>	-0,212 <sup>ns</sup>
As	0,178 <sup>ns</sup>	-0,392 <sup>**</sup>	-0,148 <sup>ns</sup>	-0,057 <sup>ns</sup>	0,332 <sup>**</sup>
Grão polido					
	Fe	Mn	Cu	Zn	Se
Cd	0,195 <sup>ns</sup>	0,270 <sup>*</sup>	0,107 <sup>ns</sup>	0,209 <sup>ns</sup>	-0,103 <sup>ns</sup>
Pb	0,323 <sup>**</sup>	0,428 <sup>**</sup>	-0,024 <sup>ns</sup>	-0,034 <sup>ns</sup>	-0,028 <sup>ns</sup>
As	0,048 <sup>ns</sup>	-0,082 <sup>ns</sup>	0,267 <sup>*</sup>	-0,071 <sup>ns</sup>	0,217 <sup>*</sup>

\*\* (P <0,001) \* (P <0,05)

A correlação observada entre o acúmulo de Cd e Mn pode ser explicada pelo compartilhamento de transportadores de metais, como o *OsNRAMP5*, que transporta Cd, Fe e Mn (ISHIMARU et al., 2012). A maior absorção de Mn pode implicar em maior absorção de Cd, a menos que haja maior quantidade de um dos elementos no solo, neste caso, os elementos irão competir entre si. A correlação positiva entre As e Se não era esperada. O efeito antagonista demonstrado pela co-adição de As e Se, reduz a absorção de As pelas raízes, além de promover seu acúmulo neste órgão, inibindo sua translocação para a parte aérea (CAMARA et al., 2019). No entanto, deve-se considerar que há uma interação complexa entre As e Se de acordo com as espécies químicas desses elementos, o que poderia explicar a correlação positiva observada em nosso estudo.

Da mesma forma, correlações entre Pb e Fe assim como Pb e Mn não eram esperados, pois até onde se sabe não há relatos de correlação entre esses elementos. Além disso, o Pb pode bloquear a entrada de cátions como Mn e Fe<sup>3+</sup> na raiz por meio de mecanismos físicos (tamanho do rádio dos íons metálicos) e mecanismos químicos (desordem induzida por metais, alterando a atividade de enzimas de membrana e a estrutura da membrana) (SHARMA; DUBEY, 2005). Por outro lado, placas de Fe e Mn na superfície radicular aumentam o sequestro de Pb nesta região, proporcionando uma forma externa de exclusão deste

elemento no solo (FAHR et al., 2013). Esses achados indicam um antagonismo entre Pb e Fe e Mn.

### **3.4 Conclusão**

Os acessos de arroz utilizados no sul do Brasil acumulam baixas concentrações de Fe e Zn (quantidade máxima de ~17 e ~27 mg kg<sup>-1</sup>, respectivamente), e com o polimento, a quantidade desses elementos é ainda mais reduzida. Por outro lado, a maioria dos genótipos acumula As acima do limite permitido no Brasil (chegando a 1 mg kg<sup>-1</sup>). Com base nesses resultados, fica evidente a necessidade de incluir essas características, o aumento de Fe e Zn e diminuição do As em grãos, como objetivos nos programas de melhoramento de arroz. Para isso, é possível indicar os genótipos BRS Fronteira, Epagri 108, IRGA 424 CL e Selênio em blocos de cruzamento para reduzir o acúmulo de As nos grãos de arroz. Os genótipos Epagri 107, Epagri 109 e Irat 162 podem ser considerados para cruzamentos visando maior acúmulo de Zn. Além disso, os genótipos BRS A701 CL, Carnaroli, Puitá Inta CL e SCS 112 podem ser usados para melhorar o acúmulo de Fe no grão. No entanto, a introdução de acessos silvestres, estrangeiros e variedades crioulas deve ser considerada, uma vez que existe pouca variabilidade para essas características entre os acessos mais utilizados no Sul do Brasil.

**4 CAPÍTULO II - Estudo de associação genômica ampla para teor de ferro nos grãos de arroz cultivados no Sul do Brasil**

## **4 Estudo de associação genômica ampla para teor de ferro nos grãos de arroz cultivados no Sul do Brasil**

### **4.1 Introdução**

O arroz (*Oryza sativa* L.) é considerado um alimento básico que contribui com até 70% das calorias diárias para mais da metade da população mundial. Uma dieta baseada em alimentos ricos em carboidratos, como o arroz, ajuda a resolver o problema da fome, mas não a fome oculta. Essa condição, que afeta uma em cada três pessoas, ocorre quando um corpo é privado de micronutrientes essenciais e permanece despercebido até que os sintomas de deficiência sejam diagnosticados. A carência de micronutrientes como o ferro (Fe) provoca a anemia ferropriva, que traz graves consequências para a saúde humana, sendo mulheres e crianças os mais vulneráveis (MAJUMDER et al., 2019).

Suplementação mineral, fortificação de alimentos e biofortificação são estratégias para aliviar a fome oculta. A abordagem mais eficaz e duradoura para os países em desenvolvimento é a biofortificação, que aumenta a concentração e a biodisponibilidade de minerais como o Fe nas partes comestíveis das plantas. A biofortificação pode ser realizada por práticas agronômicas (fertilização) ou melhoramento genético (convencional e/ou engenharia genética) (SWAMY et al., 2021), o que permite o desenvolvimento de novas cultivares com maior acúmulo de minerais. A biofortificação genética com Fe é particularmente importante em alimentos básicos como o arroz. Nesta espécie, a concentração de Fe é drasticamente reduzida devido ao processo pós-colheita para obtenção do arroz polido (MAJUMDER et al., 2019). Assim, a primeira abordagem em programas de melhoramento de plantas é desenvolver novas cultivares com maior concentração de Fe nos grãos, especialmente para atender a demanda dos consumidores de arroz integral. E a segunda é uma internalização do Fe no grão para atender o mercado de arroz polido.

O entendimento da base genética que controla a concentração de Fe nos grãos é essencial para o desenvolvimento de cultivares biofortificadas. Inúmeras pesquisas com manipulação de genes visando aumentar a concentração de Fe em grãos de arroz têm sido realizadas, conforme revisado por Viana et al. (2022)

e Wairich et al. (2022). A identificação de novos genes associados ao acúmulo de Fe em grãos de arroz pode auxiliar melhoristas no desenvolvimento de novas cultivares. A identificação de regiões cromossômicas e, em alguns casos, de alelos específicos, associados ao maior acúmulo de Fe em diferentes culturas, tem sido possível por meio de ferramentas como o estudo de associação genômica ampla (GWAS) e o mapeamento de locos de caracteres quantitativos (QTL) (CONNORTON; BALK, 2019). Diferentes estudos usando métodos de mapeamento de QTL baseados em populações biparentais identificaram QTLs que controlam o acúmulo de Fe no arroz, conforme revisado por Swamy et al. (2021). Da mesma forma, estudos de GWAS para acúmulo de Fe em arroz também foram desenvolvidos (BOLLINEDI et al., 2020; CU et al., 2021; DESCALSOTA et al., 2018; PRADHAN et al., 2020; YANG et al., 2018b; ZHANG et al., 2018). O GWAS é uma das principais abordagens para dissecar características complexas, como a qualidade nutricional, que é controlada por muitos genes e influenciada pelo ambiente (ALOMARI et al., 2019). Até esta pesquisa, nenhum estudo GWAS com cultivares brasileiras de arroz para acúmulo e internalização de Fe em grãos foi publicado. Nesse sentido, o objetivo deste estudo foi identificar regiões genômicas associadas ao acúmulo e internalização de Fe em grãos de arroz provenientes de acessos utilizados na Região Sul do Brasil.

## **4.2 Material e métodos**

### **4.2.1 Material vegetal**

Foram utilizados 81 acessos de arroz (*Oryza sativa* L.), das subespécies *indica* e *japonica*. Esses genótipos são os mesmos analisados por De Oliveira et al. (2021), exceto um (IRGA 424CL), que precisou ser removido devido a discrepância. Para a composição da coleção, foram amostrados genótipos de arroz como cultivares elite e híbridas, genótipos estrangeiros, variedades tradicionais e linhagens mutantes, representando a variabilidade genética utilizada na Região Sul do Brasil. Acessos de arroz foram cultivados sob sistema de irrigação por inundação em campos da Embrapa, Estação Experimental das Terras Baixas, localizada em Capão do Leão, Rio Grande do Sul, Brasil, nas

safras 2016/2017 e 2018/2019. O delineamento experimental foi de blocos ao acaso, com três repetições, mas com diferentes comprimentos de linha, 1,0 m e 1,5 m, nas safras 2016/2017 e 2018/2019, respectivamente (DE OLIVEIRA et al., 2021). Cada linha foi espaçada em 0,20 m, e foram semeadas manualmente 45 sementes por metro linear, sendo cada linha constituída por um genótipo, conforme descrito por De Oliveira et al. (2021). O manejo agrícola e fitossanitário foi feito de acordo com as recomendações técnicas para o cultivo de arroz no sul do Brasil (SOSBAI, 2018).

Cada genótipo foi colhido manualmente e as panículas foram debulhadas. Então, foi dividido em duas partes: o arroz integral era apenas descascado e o arroz polido era descascado e polido. Após, as amostras foram moídas em um moinho com peneira de abertura 0,25 mm (modelo MA020, Marconi, Piracicaba, Brasil). Para verificar a quantificação de Fe, as amostras foram pesadas em 0,1 g de farinha e colocadas em tubos de polipropileno estéreis de 15 mL.

#### **4.2.2 Avaliação Fenotípica**

A quantificação de ferro em grãos foi realizada na Universidade Federal do ABC, conforme demonstrado em De Oliveira et al. (2021). Para isso, tubos contendo a farinha foram adicionados 1 mL de ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ) (65% m/m, Synth, Diadema, Brasil) para a pré-digestão durante 24 horas. Posteriormente, para a digestão, os tubos foram dispostos em banho-maria (modelo SL1522L, Solab, Piracicaba, Brasil), à 90°C, durante 4 horas, sendo agitados a cada 30 minutos. Em seguida, as amostras receberam água ultrapura para completar o volume de 15 mL. Finalmente, a quantificação de Fe foi realizada usando a espectrometria de massa de plasma acoplado indutivamente (modelo ICP-MS 7900, Agilent, Hachioji, Japão) (DE OLIVEIRA et al., 2021). O procedimento mais detalhado, os padrões utilizados e o controle de qualidade podem ser obtidos em De Oliveira et al. (2021).

#### **4.2.3 Genotipagem**

O DNA foi extraído das folhas das plântulas, utilizando o protocolo CTAB (brometo de hexadeciltrimetilamônio), conforme exigido pelo laboratório de

genotipagem. A quantidade, qualidade e integridade do DNA foram verificadas em espectrofotômetro (NanoVue™ Plus Spectrophotometer) e eletroforese em gel de agarose. A genotipagem foi realizada no Laboratório de Serviços de Genotipagem do Instituto Internacional de Pesquisa de Arroz (IRRI), Filipinas, usando 7098 marcadores SNP da plataforma de genotipagem 7K Infinium SNP (Illumina®) (versão atualizada da matriz 6K Infinium) (THOMSON et al., 2017). Os dados de genotipagem foram filtrados usando TASSEL V.5.2.41 (BRADBURY et al., 2007). Os acessos tiveram taxas de chamada  $< 0,75$ , e SNPs com dados perdidos  $> 20\%$  e frequência de alelos menores  $\leq 5\%$  foram removidos, restando 4,093 marcadores SNP, conforme apresentado em Venske et al. (2018).

#### 4.2.4 Análise de dados e GWAS

A matriz de estrutura da população foi gerada a partir do método de agrupamento bayesiano usando o software fastSTRUCTURE (RAJ et al., 2014). De  $k = 1$  a  $k = 10$ , os componentes do modelo usados para explicar a estrutura nos dados foram selecionados com o comando chooseK.py (VENSKE et al., 2018). A matriz de parentesco foi obtida usando o software TASSEL V.5.2.44 (BRADBURY et al., 2007). Essas duas matrizes são incluídas na análise de associações para diminuir os falsos positivos.

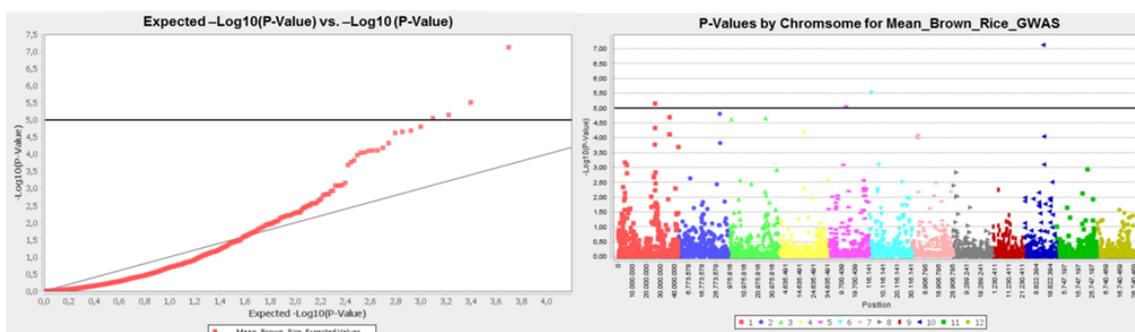
Análises de mapeamento associativo também foram realizadas no software TASSEL V.5.2.44, usando um modelo linear misto. Este modelo inclui dados de fenotipagem (níveis de Fe), dados de genotipagem (SNPs), estrutura populacional e matrizes de parentesco. Os resultados são apresentados em QQ Plot e Manhattan Plot. O limiar de significância foi determinado com base nos métodos de correção de Bonferroni (BC), utilizando a equação:  $P\text{-valor BC} = 0,05/k$ , onde  $k$  é o número total de marcadores (ALQUDAH et al., 2020).

A base de dados do projeto de anotação do genoma (<http://rapdb.dna.affrc.go.jp/>) foi utilizada para a dissecação de regiões cromossômicas que apresentam SNPs associados ao Fe. Para identificar genes candidatos ligados a SNPs associados ao Fe, foi verificada a localização física de cada SNP em cada cromossomo. A partir desta posição, foi analisada uma região de 10kb para cada lado.

### 4.3 Resultados e discussão

Nos países em desenvolvimento, onde a população consome basicamente arroz e não consegue obter uma dieta diversificada, a fome oculta é comum. Portanto, a biofortificação genética, especialmente com Fe, é uma abordagem fundamental para lidar com essa situação que afeta milhões de pessoas. Estudos de mapeamento de genes que controlam a deposição mineral em grãos são importantes para o melhoramento genético. No entanto, o acúmulo de minerais no grão de arroz tem herança poligênica, os genes têm baixos efeitos individuais e são distribuídos dispersamente no pool gênico (DESCALSOTA et al., 2018; HUANG et al., 2015; SWAMY et al., 2018b). Nesses casos, o mapeamento da população biparental pode ser difícil e os estudos de associação de genômica ampla (GWAS) podem fornecer melhores resultados (BOLLINEDI et al., 2020). Nesta pesquisa, um GWAS para acúmulo de Fe nos grãos foi desenvolvido em uma coleção com 81 acessos de arroz cultivados na Região Sul do Brasil. A estrutura da população e o desequilíbrio de ligação, bem como a variabilidade genética para Fe em grãos para esta coleção foram apresentados anteriormente por De Oliveira et al. (2021) e Venske et al. (2019).

Com base nos métodos de correção de Bonferroni, os SNPs associados com Fe foram identificados a partir de um limiar como  $-\log_{10}(P)$ -valor 5. Nenhum SNP significativo associado ao Fe foi encontrado para grãos polidos. Para grãos integrais, os SNPs significativos se movem em direção ao eixo y, onde os valores-p observados são altamente e significativamente diferentes dos valores-p esperados sob a hipótese nula (Figura 9).



**Figura 9.** Gráfico de Quantile-quantile (QQ) de marcadores SNP e gráfico de Manhattan plot do  $-\text{Log}_{10}(P)$  vs, posição do cromossômica de marcadores SNP associado ao teor de Fe em arroz integral em um painel diverso cultivado no sul do Brasil.

Os SNPs significativos associados ao Fe no arroz integral foram mapeados nos cromossomos 1, 5, 6 e 10 (Figura 9, Tabela 10). Curiosamente, em estudos de GWAS desenvolvidos até o momento, nenhum SNP localizado nos cromossomos 5 e 10 foi associado a esta característica. Ao analisar 529 acessos de arroz, Yang et al. (2018b) verificaram que os SNPs associados ao Fe estão localizados apenas no cromossomo 4. Bollinedi et al, (2020) examinaram 192 acessos de arroz e detectaram SNPs associados ao Fe nos cromossomos 2, 3, 6 e 7. No presente estudo, o SNP encontrado no cromossomo 6 está na posição 1,780,414 (Tabela 10), enquanto o SNP detectado por Bollinedi et al. (2020) no mesmo cromossomo está na posição 30,278,880. Por estarem localizados nos braços opostos do cromossomo, os SNP identificados neste estudo podem sugerir uma nova região cromossômica com genes candidatos ao acúmulo de Fe no arroz integral. Em outro estudo, desenvolvido por Cu et al. (2021), utilizando aproximadamente 200 genótipos de arroz, os SNPs associados ao Fe estão localizados nos cromossomos 1, 2, 3, 7, 8 e 12. Os dois SNPs encontrados por Cu et al. (2021) no cromossomo 1 estão no braço curto, enquanto no presente estudo, o SNP detectado no mesmo cromossomo está no braço longo. Mais uma vez, o SNP identificado nesta pesquisa está em uma região diferente no cromossomo 1, e esta área pode apresentar novos genes candidatos ao acúmulo de Fe no arroz integral.

**Tabela 10.** Resumo de SNPs mapeados e mineração de genes para teor de Fe em grãos de arroz integral em um painel diverso cultivado no sul do Brasil.

Chr	SNP id	Alelos (principal)	$-\text{Log}_{10}$ (P-value)	Posição (bp)	Gene*
1	1015467	G	5,148	26,463,706	1
5	5283606	T	5,052	13,233,092	2
6	S6_11780414	A	5,511	1,780,414	7
10	-1013843768	C	7,125	13,915,001	3

\*Genes anotados em RAP-DB (região 20 kb)

Se as populações biparentais forem consideradas, há relatos de marcadores SSR e RFLP associados ao Fe no arroz integral localizado no cromossomo 5 (ANURADHA et al., 2012; KUMAR et al., 2019; ZHANG et al., 2014) e 10 (ZHANG et al., 2014). Zhang et al. (2014) mapearam dois QTLs no cromossomo 10, um em cada braço. O SNP detectado no presente estudo encontra-se no braço longo do cromossomo 10 e pode estar próximo da região descoberta por Zhang et al. (2014). Os QTLs encontrados por Anuradha et al. (2012), Zhang et al. (2014) e Kumar et al. (2019) estão situados no braço curto do cromossomo 5, região oposta à localização do SNP identificado nesta pesquisa.

Quando uma região de 20kb (10kb de cada lado) foi dissecada da localização de SNPs significativos nos cromossomos 1, 5, 6 e 10, foram identificados 1, 2, 7 e 3 genes, respectivamente (Tabelas 10 e 11). No cromossomo 1, o gene *Os01g0653800* codifica a proteína contendo o domínio repetido WD40. Essas proteínas estão envolvidas na transdução de sinal, sinalização luminosa, regulação da transcrição, ciclo celular e citocinese, processamento de mRNA, transporte de proteínas, floração, biossíntese de antocianinas, fissão mitocondrial e montagem da cromatina (HE; HO, 2018). No arroz, o gene *OsWD1*, um membro da família de proteínas de repetição WD40, está envolvido na biossíntese e sinalização de GA, aumentando a expressão de genes induzidos por GA - *OsEP3A* e  $\alpha$ -amilase, com papel positivo no desenvolvimento de plântulas e tamanho de grão (HE; HO, 2018). Esses resultados demonstraram o papel dos genes WD nos grãos e, portanto, apoiam a hipótese de que o membro da família WD40 de proteínas repetidas identificado neste estudo (*Os01g0653800*) pode ter algum envolvimento no desenvolvimento e/ou composição do grão.

**Tabela 11.** Anotação de genes no RAP-DB minerados dentro do QTL mapeado para teor de Fe em grãos de arroz integral em uma coleção de arroz cultivado no sul do Brasil.

Chr	Gene ID	Variante transcritos	Anotação	Posição do gene	
1	<i>Os01g0653800</i>	<i>Os01t0653800-01</i>	Similar to predicted protein;	26,457,976~26,465,951	
		<i>Os01t0653800-02</i>	WD40 repeat-like domain containing protein;	26,453,784~26,465,951	
		<i>Os01t0653800-03</i>	Similar to Peptidase S8 and S53, subtilisin, kexin;	26,454,207~26,459,369	
	<i>Os05g0296900</i>	<i>Os05t0296900-01</i>	Hypothetical conserved gene;	13,229,992~13,230,715	
	<i>Os05g0297001</i>	<i>Os05t0297001-01</i>	Similar to predicted protein;	13,232,746~13,234,909	
6	<i>Os06g0133000</i>	<i>Os06t0133000-01</i>	Granule-bound starch synthase 1;	1,765,622~1,770,574	
		<i>Os06t0133000-02</i>	Synthesis of amylose in endosperm;	1,766,470~1,770,653	
	<i>Os06g0133100</i>	<i>Os06t0133100-01</i>	Hypothetical protein;	1,769,541~1,770,459	
	<i>Os06g0133200</i>	<i>Os06t0133200-01</i>	Conserved hypothetical protein;	1,776,726~1,777,351	
	<i>Os06g0133300</i>	<i>Os06t0133300-00</i>	Hypothetical conserved gene;	1,780,570~1,780,854	
	<i>Os06g0134400</i>	<i>Os06t0134400-01</i>	Protein of unknown function DUF3615 domain containing protein;	1,784,324~1,784,813	
	<i>Os06g0133500</i>	<i>Os06t0133500-00</i>	Conserved hypothetical protein;	1,785,455~1,785,802	
	<i>Os06g0133600</i>	<i>Os06t0133600-01</i>	Phosphate-induced protein 1 Conserved region family protein;	1,789,916~1,791,294	
		<i>Os06t0133600-02</i>		1,789,946~1,791,291	
10	<i>Os10g0406800</i>	<i>Os10t0406800-01</i>	Armadillo-like helical domain containing protein;	13,919,961~13,925,636	
		<i>Os10g0406701</i>	<i>Os10t0406701-01</i>	Conserved hypothetical protein;	13,908,015~13,912,718
		<i>Os10g0406600</i>	<i>Os10t0406600-01</i>	Complex 1 LYR protein family protein.;	13,905,198~13,906,597

Ao lado do SNP no cromossomo 5, foram identificados dois genes com função desconhecida. Entre os sete genes encontrados próximos ao SNP no cromossomo 6, destacam-se os que codificam a amido sintase I ligado ao grânulo (*Os06g0133000*) e a região conservada da família da proteína induzida por fosfato 1 (*Os06g0133600*). A amido sintase I ligado ao grânulo (*Os06g0133000*) é responsável pela síntese de amilose e também contribui para a síntese de amilopectina (LIU et al., 2013). Apesar da ação direta dessa enzima no grão, uma das principais enzimas responsáveis pela composição do amido no endosperma, é difícil estabelecer uma relação entre amido sintase I ligado ao grânulo e o acúmulo de Fe nos grãos. Um estudo feito por Quan et al. (2019) demonstrou que a maioria dos genes induzido por fosfato 1 (*PHI-1*) em arroz são intensamente expressos durante o desenvolvimento da panícula. Portanto, *Os06g0133600* detectado neste estudo pode estar associado à deposição de Fe nos grãos.

O domínio helicoidal Armadillo (*Os10g0406800*) é um dos genes localizados próximo ao SNP no cromossomo 10. Os domínios Armadillo pertencem a uma classe de proteínas formadoras de hélices, que atuam nas interações proteína-proteína. Essas proteínas desempenham um papel importante no desenvolvimento, divisão celular, morte celular e crescimento lateral da raiz (JIA et al., 2010). Um estudo conduzido por Jia et al. (2010) demonstraram que o desenvolvimento de raízes curtas pós-embriônico 1 (*OsSPR1*), um gene contendo Armadillo, codifica uma proteína mitocondrial e está envolvida no desenvolvimento da raiz e na homeostase do Fe no arroz. Levando em consideração esse papel do *OsSPR1*, o gene *Os10g0406800* identificado neste estudo pode ser considerado um candidato interessante para o acúmulo de Fe em grãos integrais.

#### **4.4 Conclusão**

Nesta pesquisa, são apresentados 13 genes candidatos ao acúmulo de Fe em grãos de arroz integral, localizados nos cromossomos 1, 5, 6 e 10. Certos genes têm função desconhecida, outros estão associados ao tamanho, desenvolvimento e composição do grão, e alguns outros genes mostraram uma

relação com a homeostase do Fe. O papel exato desses genes no acúmulo de Fe em grãos de arroz deve ser elucidado a partir de outros novos estudos.

**5 CAPÍTULO III - Construção de plasmídeo para análise funcional mediada por CRISPR do gene *OsIRO3***

## 5 Construção de plasmídeo para análise funcional mediada por CRISPR do gene *OsIRO3*

### 5.1 Introdução

O arroz (*Oryza sativa* L.) é um dos cereais mais produzidos no mundo e é um alimento básico para quase 50% da população mundial (MAHENDER et al., 2019; RASHEED et al., 2020a; TABASSUM et al., 2021). Apesar da importância deste cereal como fonte de energia, o arroz é pobre em micronutrientes como ferro (Fe). Dessa forma, nos países em que o arroz é o componente majoritário da dieta, pode ocorrer a deficiência de micronutrientes, chamada de fome oculta. No caso do Fe, a principal consequência é a anemia por deficiência de Fe (IDA - *Iron Deficiency Anemia*), que ocorre principalmente em países da Ásia e África (GEDFIE et al., 2022).

O ferro é um elemento traço dos mais abundantes da terra (ABBASPOUR et al., 2014; QUINTERO-GUTIÉRREZ et al., 2008; WOOD et al., 2005; NEMETH; GANZ 2021), é um componente essencial para o crescimento e desenvolvimento de todos os organismos vivos (AISEN et al., 2001; LIEU et al., 2001; HINO et al., 2022). Em humanos, o Fe contido nas hemoglobinas dos glóbulos vermelhos, atua principalmente no transporte de oxigênio dos pulmões em direção ao corpo inteiro (WESSLING-RESNICK, 2017; NEMETH; GANZ 2021). Também é responsável pelo transporte de elétrons na síntese de ATP e na respiração das mitocôndrias. Além disso está envolvido na atividade catalítica de algumas enzimas específicas (BLOMBERG; SIEGBAHN, 2003; LEVENSON; TASSABEHJ, 2004; RAMSEY et al., 1996; VRANKA et al., 2004; WESSLING-RESNICK, 2017; NEMETH; GANZ 2021).

O Fe livre encontrado nos solos é caracterizado por apresentar uma atividade excessivamente baixa, provocando uma redução drástica no processo de captação, promovendo a deficiência de Fe, que é um distúrbio nas plantas. Por outro lado, em solos alagados, usados para cultivo de arroz, pode ocorrer alta concentração de Fe<sup>+2</sup>, que pode ser tóxico para as plantas (revisado por SANTOS et al., 2017; KAR et al.; 2020). Entretanto, mesmo em solos com alta disponibilidade de Fe, esse elemento não é transportado e internalizado no grão.

As plantas criaram duas estratégias diferentes de captação de Fe com o intuito de absorver a quantidade adequada, e impedir a deficiência e/ou toxicidade (WELCH, 2002). Tanto nas dicotiledôneas quanto as monocotiledôneas não gramíneas/Poaceae a absorção do Fe é realizada por transportadores regulados por ferro (IRT), ocorrendo a redução do Fe<sup>3+</sup> oxidado para a forma Fe<sup>2+</sup>, com o auxílio da enzima redutase férrica oxidase 2 (FRO2 – *Ferric Reductase Oxidase*) localizado na membrana plasmática, esse processo é determinado com estratégia I de captação de Fe (EIDE et al., 1996; ROBINSON et al., 1999; revisado por LI et al., 2023).

Já as plantas gramíneas utilizam a estratégia II de captação, que visa solubilizar o Fe situado na rizosfera a partir da síntese e secreção de quelantes naturais de Fe, como os fitosideróforos da família do ácido muginéico (MAs) (TAKAGI, 1976; RÖMHELD; MARCHNER 1986; MORI 1999; revisado por LI et al., 2023). Após a formação dos complexos Fe<sup>3+</sup>-MA, ocorre a absorção pela raiz via transportadores codificados pelos genes *Yellow Stripe 1* (YS1), o qual foi estudado primeiramente no milho (CURIE et al., 2001). Análises eletrofisiológicas feitas na proteína YS1 demonstraram que o seu funcionamento é como simportador acoplado a prótons para vários MAs ligados em metais, ou seja, quelantes de metais como Fe<sup>3+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup> (SCHAAF et al. 2004). MAs são sintetizados a partir de L-Met, que é convertida a Nicotianamina (NA), que vai produzir DMA (ácido desoximuginéico), o primeiro MA sintetizado nessa rota. As etapas subsequentes diferem da espécie e da cultivar, por exemplo, arroz sintetiza apenas DMA, enquanto que cevada sintetiza MA, ácido 3-hidroximuginéico e ácido 3-epi-hidroximuginéico (revisado por BASHIR et al., 2010).

Os genes que participam na estratégia I ou II de captação de Fe apresentam expressão diferencial em condição de deficiência de Fe (WALKER et al., 2008, revisado por RAI et al., 2021). Estudos de transcriptoma tem demonstrado a presença de outros genes diferencialmente expressos sob deficiência de Fe, sugerindo função essencial desses genes na resposta à essa condição (OGO et al., 2006; THIMM et al., 2001; ZHENG et al., 2009). Dentre esses genes, destacam-se os que codificam fatores de transcrições, devido à importância na regulação da transcrição de genes envolvidos nas estratégias I e II. Em arroz, o fator de transcrição *OsIRO2* (*iron-deficiency inducible*), da família

Hélice-volta-hélice básico (*Basic-helix-loop-helix - bHLH*), atua como regulador positivo dos genes que participam na captação de Fe pela estratégia II (OGO et al., 2006; revisado por LIANG, 2022). Porém quando o estudo é direcionado para o *OsIRO3*, é observado que esse fator de transcrição atua como um regulador negativo na resposta à deficiência ao Fe. Foi verificado que o *OsIRO3* suprimiu a ativação dos genes responsivos à deficiência de Fe ou quando há pouca disponibilidade de Fe no solo (ZHENG et al., 2010; revisado por LIANG, 2022). Dessa forma, o silenciamento desse gene pode contribuir com a maior captação de Fe pela planta e maior transporte para o grão.

A estratégia de biofortificação genética de Fe é promissora para amenizar a deficiência desse elemento traço. É considerada uma técnica inovadora da agricultura por desenvolver genótipos com maiores concentrações de micronutrientes, sendo economicamente viável, e eficaz em mitigar a ocorrência de doenças relacionadas à ingestão inadequada dos nutrientes (BOUIS; SALTZMAN, 2017; revisado por KUMARI et al., 2022). Com isso, a cultura do arroz se demonstra um ótimo candidato à biofortificação, uma vez que é cultivado em solos com elevadas concentrações de Fe e é um dos alimentos básicos amplamente consumido em grande parte do mundo. Além disso, por ser uma espécie modelo com o genoma já sequenciado, permite com mais facilidade o desenvolvimento de muitos estudos moleculares, assim como as estratégias de absorção de Fe e mecanismos de transporte desse micronutriente (BECKER; ASCH, 2005; MASUDA et al., 2012; VASCONCELOS; GRUISSEM; BHULLAR, 2017; revisado por ZAGHUM et al., 2022).

Dentre as técnicas de biofortificação, a edição de genomas pela tecnologia CRISPR (*Clustered Regulatory Interspaced Palindromic Repeats*) trouxe uma nova possibilidade para os pesquisadores, e pode ser utilizada na biofortificação genética de Fe em arroz. Um exemplo potencial para aplicação da tecnologia CRISPR é o silenciamento gênico ou o ajuste da expressão de genes envolvidos na homeostase do Fe (LUDWIG e SLAMET-LOEDIN, 2019). Recentemente, tem sido reportado na literatura a utilização do sistema CRISPR visando a biofortificação com Fe em arroz (ROY; SONY 2021; LI et al., 2022).

Diante do exposto, o objetivo do estudo foi a construção de um plasmídeo para silenciamento do gene *OsIRO3* em plantas de arroz visando maior captação e acúmulo de Fe no grão.

## 5.2 Material e métodos

Este estudo foi desenvolvido durante o período de doutorado sanduíche, seis meses (novembro de 2021 até abril de 2022), no laboratório pertencente ao Departamento de Biociências, da Università degli Studi di Milano (UNIMI), em Milão na Itália, sob a orientação do professor Martin Kater.

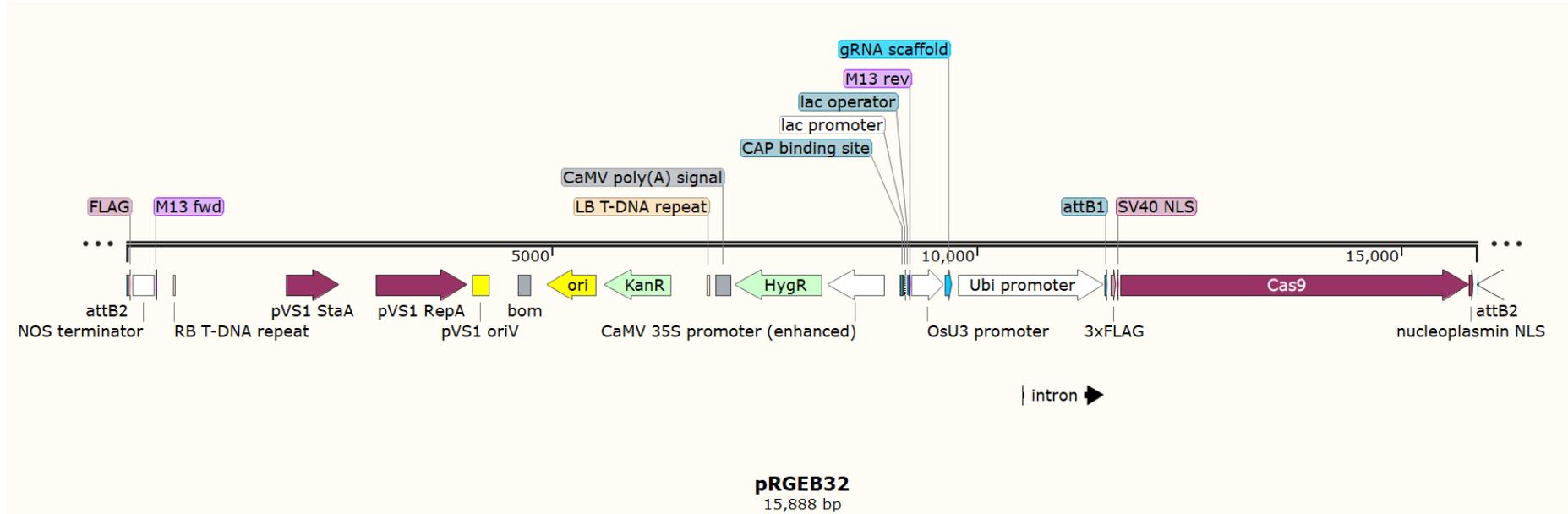
Visando o silenciamento do gene *OsIRO3* (*Os03g0379300*) foi utilizada a ferramenta CRISPR-Cas9 (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*). Como o gene *OsIRO3* apresenta três transcritos alternativos, o sgRNA foi desenhado em uma região consenso da sequência codificadora dos três transcritos, para que todas as proteínas codificadas por esse gene sejam truncadas.

A sequência referente ao gene *OsIRO3*, com região codificadora de 1308pb, foi adquirida no banco de dados EnsemblPlants (*Ensemble Plants database*) (<http://plants.ensembl.org>). Para o desenho do RNA guia foi utilizado o programa Chop chop ([Chopchop.cbu.uib.no](http://Chopchop.cbu.uib.no)). No programa foi inserido o ID do gene [LOC\_Os03g26210 (MSU)] e uma lista de alvos putativos com 20pb foi gerada, no qual foi possível escolher o gRNA mais apropriado para realizar a edição gênica. Foi utilizado o plasmídeo vazio da empresa Addgene, e a sequência do gRNA (GGAAGGTTCAAAATCTGAG) foi utilizada para realizar a construção.

O plasmídeo contém os genes de resistência para os agentes seletivos canamicina na bactéria e higromicina na planta (Figura 10). A empresa Addgene forneceu o plasmídeo pRGEB32, cujo esqueleto foi baseado no plasmídeo pRGEB31. A alteração é a substituição do promotor 35S pelo promotor UBI de arroz mais 5'-UTR. Foi utilizado o promotor snoRNA U3 em arroz para a expressão gRNA/PTG e promotor UBI para a expressão do Cas9.

Para multiplicação do plasmídeo foi utilizado *E. coli*, cepa DH5alpha, incubada à 37°C. Quanto às informações de clonagem, se utiliza o método de enzimas de restrição ou sistema Gateway (attB). Os *primers* de sequenciamento foram 5' M13R e 3' M13F (XIE et al., 2015). Como não será fornecido nenhum DNA doador, espera-se que o reparo da quebra da dupla fita de DNA,

ocasionado pela Cas9, seja feito pelo mecanismo de junção final não homóloga (NHEJ), levando a inserções e/ou deleções no gene alvo, o que resultará em proteína truncada.



**Figura 10.** Representação esquemática do plasmídeo que será utilizado para edição do gene *OsIRO3*. FLAG: FLAG® alvo epítipo, seguido por um local de clivagem de enteroquinase. M13 fwd: iniciador de sequenciamento comum, uma das múltiplas variantes semelhantes. RB T-DNA repeat: *right border* - repetição de borda direita de nopalina C58 T-DNA. pVS1 StaA: proteína de estabilidade do plasmídeo *Pseudomonas* pVS1 (HEEB et al., 2000). pVS1 RepA: proteína de replicação do plasmídeo *Pseudomonas* pVS1 (HEEB et al., 2000). pVS1 oriV: origem de replicação para o plasmídeo *Pseudomonas* pVS1 (HEEB et al., 2000). Bom: base da região de mobilidade de pBR322. Ori: número de cópias alto ColE1/pMB1/pBR322/pUC origem de replicação. KanR: sequência do gene cuja proteína confere resistência ao antibiótico canamicina (na bactéria). NOS terminator: terminador de nopalina sintase e sinal poli(A). LB T-DNA repeat: *left border* – repetição de borda esquerda de nopalina C58 T-DNA. CaMV poly(A) signal: sinal de poliadenilação do *Cauliflower mosaic virus* (CaMV). HygR: sequência do gene no qual proteína confirma a resistência ao antibiótico higromicina (na planta). CaMV 35S promoter (enhanced): promotor do *Cauliflower mosaic virus* (CaMV), com uma região intensificadora duplicada - promotor usado para o gene Hygro. CAP binding site: A ligação CAP ativa a transcrição na presença de cAMP. lac promoter: promotor para *E. coli* lac operon. lac opeator: O repressor lac se liga ao operador lac para inibir a transcrição em *E. coli*. Esta inibição pode ser aliviada pela adição de lactose ou isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo (IPTG). M13 rev: iniciador de sequenciamento comum, uma das múltiplas variantes semelhantes. gRNA scaffold: RNA guia para o sistema CRISPR/Cas9 de *Streptococcus pyogenes*. OsU3 promoter: *Oryza sativa* L. (arroz) promotor do snRNA U3. Ubi promoter: promotor do gene de poliubiquitina de arroz (*Oryza sativa* L.) RUBQ2. attB1: local de recombinação para a reação Gateway® BP. 3xFLAG: três alvos de epítipo FLAG® em tandem, seguidas por um local de clivagem de enteroquinase. SV40 NILS: sinal de localização nuclear do antígeno T grande SV40 (vírus símio 40). Cas9: Cas9 (Csn1) endonuclease do sistema CRISPR/Cas de *Streptococcus pyogenes* Tipo II. Nucleoplamin NILS: sinal de localização nuclear bipartido da nucleoplasmina. attB2: versão mutante de *attB*.

Para gerar os gRNAs para inserir no plasmídeo, foi realizado uma série de passos. Primeiramente, foi desenhado dois pares de *primers*, denominados *IRO3a Forward* (TAGGTCTCCCACAAATCTGAGggttagagctagaa), *IRO3a Reverse* (ATGGTCTCATGTGAACCTTCctgcaccagccgggaa), *IRO3b Forward* (TAGGTCTCCTTAAGAGATCTGggttagagctagaa) e *IRO3b Reverse* (ATGGTCTCATTAAGATCCGGGtgcaccagccgggaa). Além disso, foram utilizados *primers* para criar os sítios de restrição. Foram usados dois pares de *primers* para tentar clonar dois RNAs guias, porém só foi possível clonar o *IRO3a*. Depois, foram criados fragmentos de PCR (3 fragmentos, então 3 PCRs diferentes), para serem inseridos os sítios de enzima de restrição e fragmentos que compõe o gRNA.

Para a reação de PCR foi utilizado 2 µl de cDNA, e um mix [1 µl de cada *primer* (*forward* e *reverse*), 4 µl de Buffer 5x, 1,6 µl de dNTP's, 0,08 µl de Taq Q5, 9,6 µl de água] para fechar uma reação com 20 µl. Os tubos foram incubados no termociclador com a programação: desnaturação inicial: 2 minutos em 98°C; desnaturação: 30 segundos em 98°C, anelamento: 30 segundos em 50°C e extensão: 20 segundos em 72°C, sendo estas etapas repetidas por 34 vezes; e extensão final: 5 minutos em 72°C, seguido de 20°C até as amostras serem retiradas do termociclador.

Os fragmentos de PCRs gerados foram o P90 [LSADS - F (OSP 1198) e IRO3a R (OSP2166)], P91 [IRO3a F (OSP 2165) e IRO3b R (OSP2168)] e P92 [IRO3b F (OSP 2167) e L3ADS - R (OSP1199)]. Posteriormente, foi feita a purificação dos fragmentos. Não houve necessidade de fazer um gel devido os fragmentos serem muito pequenos e com isso não é possível se distinguir dos *primers*.

Para realizar a purificação da reação de PCR, primeiramente foi adicionado 100µl de água. Posteriormente, em tubos novos foi colocado o produto de PCR acrescentado com água e adicionado 200µl de um mix, que é composto por 40 mL de isopropanol, 2mL de acetato de sódio e 8mL de água. Em seguida foi incubado no freezer à - 20°C *overnight*. No outro dia, foi feita a centrifugação por 20 minutos, adicionado 300µl de etanol 70% para limpar o pellet, seguido de centrifugação por mais 10 minutos. Após retirado o etanol 70%

os tubos foram transportados para o secador na temperatura de 65°C, deixando os tubos com a tampa aberta, por um período de duas a três horas para a evaporação total do álcool. Por fim, foi acrescentado 17µl de água, desses 17µl, 1µl foi colocado no aparelho Nanodrop para quantificação.

Os fragmentos de PCR purificados foram submetidos à reação conhecida como alinhamento GG (GG Assembly), que têm a função de juntar vários fragmentos de DNA. Para isso, foi selecionado *amplicons* com concentração de 25 a 50 ng, ou seja, do P90, P91 e P92. Primeiramente foi selecionado o 7,25 µl do fragmento do PCR purificado, e um mix [10 µl de 2x T7 Buffer DNA ligase, 2 µl de BSA 10x (1mg/1mL), 0,25 µl de *Bsa I* e 0,5 µl de T7 DNA ligase, resultando em 20µl no total]. Um volume de 12,75 µl desse mix e 7,25 µl do fragmento do PCR purificado foram inseridos no tubo e incubado no termociclador com a programação: 5 minutos à 37°C e 10 minutos de 20°C, sendo estas etapas repetidas por 51 ciclos, seguido de 60 minutos à 20°C. Posteriormente, foi feita a digestão do plasmídeo pRGEB32 com *Bsa I*, separadamente. Para isso, em um tubo foi colocado 13µl de pRGEB32 (2 µg), 2 µl de 10x NEB Buffer 4, 2 µl de 10x BSA, 1 µl de *Bsa I* (NEB) e 2 µl de dH<sub>2</sub>O, totalizando 20 µl, e foi colocado à 37°C por uma hora.

Após a digestão do plasmídeo, foi feita a reação de ligação para inserir os fragmentos no plasmídeo. Para a ligação foi feita uma diluição 1:10 (10 µl de amostra em 90 µl de água). Após 20 minutos, as células competentes de *E. coli* junto com a ligação (100 µl da ligação diluída 1:100) foram colocadas na cubeta, contendo um volume cerca de 200µl para a realização do choque. Para o choque, foi utilizado 1500 volts por 5 segundos e logo foi acrescentado 400µl de LB líquido. Foi colocado novamente para o tubo e transportado para um ambiente com a temperatura controlada à 37°C por 2 horas. Posteriormente, foi centrifugado por 1 minuto e removido 400 µl, referente a quantidade adicionada de LB inserido, e deixado só as células competentes. Em seguida, as células competentes foram ressuspensas e inseridas na placa contendo LB sólido com antibiótico ampicilina (100mg L<sup>-1</sup>), e alocadas para um ambiente controlado à 37°C.

Posteriormente, foi feita extração de DNA plasmidial. Para isso, foi selecionado 5 mL de cultura saturada em LB (Luria-Bertani) (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989) líquido de *E. coli*, centrifugado por 30 segundos em

uma rotação de 11000xg para a formação do pellet das células, e o sobrenadante foi descartado. Em seguida, foi adicionado 250µl de Buffer A1 e os pellets das células foram ressuspensos completamente pelo vórtex ou através da pipeta (foi verificado se não teve muitos grumos antes de adicionar o buffer A2). Logo foi acrescentado 250µl de buffer A2 invertendo o tubo de 6 a 8 vezes (sem utilizar o vórtex). Foi incubado em temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida, foi adicionado 300µl de buffer A3, realizando a mistura, invertendo o tubo de 6 a 8 vezes, até a cor ser perdida completamente (também não foi utilizado o vórtex nessa etapa).

Posteriormente foi feita a centrifugação por 5 minutos na rotação de 11000xg em temperatura ambiente. Em seguida foi colocado no tubo que contém a membrana e a coluna, decantando o sobrenadante referente ao passo anterior ou no máximo 700µl. Logo, foi feita a centrifugação por 1 minuto na rotação de 11000xg. Por fim, foi descartado o sobrenadante e a etapa repetida devido ainda conter o lisado. Foram acrescentados 500µl de Buffer AW, pré-aquecido a 50°C e centrifugado durante 1 minuto na rotação de 11000xg, antes do processo que usa o Buffer A4. Foi adicionado o buffer AW para lavagem que apresenta a função de aumentar a leitura do sequenciamento do DNA por melhorar o desempenho das reações enzimáticas.

Posteriormente, foi acrescentado o buffer A4, centrifugado por 1 minuto à 11000xg. Descartado o sobrenadante e colocado na membrana em uma nova coluna no tubo. Em seguida, centrifugado por 2 minutos à 11000xg e descartado a coluna do tubo. Foi colocado a membrana em um tubo de 1,5mL e adicionado 50µl do buffer AE. Posteriormente, incubado por 1 minuto em temperatura ambiente e centrifugado por 1 minuto na rotação de 11000xg.

Após a purificação, foi realizada uma diluição de 1:10, no qual foi acrescentado 180 µl de dH<sub>2</sub>O. Em seguida, foi utilizado 2µl para fazer um PCR da reação GG diluída. Para a reação do PCR foi feito um mix com 1 µl de cada *primer* desenhado (OsP1200 -  
 OsP\_1200CGGGTCTCAGGCAGGATGGGCAGTCTGGGCA0.05DST S5AD5F  
 e OsP1201 -  
 OsP\_1201TAGGTCTCCAAACGGATGAGCGACAGCAAAC0.05DST S3AD5R),  
 1,6 µl de dNTP's, 0,4 µl de Taq Q5 e 12 µl de dH<sub>2</sub>O, totalizando 20 µl de reação. No tubo foi inserido 2 µl do alinhamento GG diluído 1:10 e 18 µl do mix. Para a

reação de PCR os tubos foram colocados no termociclador com a programação: desnaturação inicial: 5 minutos de 95°C; desnaturação: 30 segundos à 95°C, anelamento: 30 segundos à 55°C, extensão: 45 segundos de 72°C, sendo essas etapas repetidas 41 vezes; e extensão final: 10 minutos de 72°C.

Finalizando a reação, foi adicionado 22 µl de dH<sub>2</sub>O para obter um total de 42 µl e utilizar para a digestão com *FokI*. Foi acrescentado 3 µl de *FokI* e 5 µl de 10x SmartCutBuffer, resultando em um volume final de 50 µl. Posteriormente, foi incubado por 1 hora à 37°C no termociclador. Em seguida, foi feito um gel de agarose para ver o tamanho das bandas.

Para fazer o gel de agarose, foi pesado 0,75 gramas de agarose, colocado num frasco de 100 ml e adicionado 50 ml de TBE 1x. Esse frasco foi para o microondas por aproximadamente um minuto, até a agarose se dissolver completamente. Posteriormente, após esperar 15 minutos foi acrescentado 3µl de brometo etílico, misturado e despejado no suporte da cuba. Depois que o gel estava solidificado, foi inserido na cuba para realizar a corrida. No gel, antes da corrida se inseriu 2µl de marcador molecular e 10µl das amostras que foram retiradas da amostra digerida pela *FokI*. Logo, foi efetuada a corrida na velocidade de 90 volts, durante 40 minutos e por fim foram isoladas as bandas do gel que obtiveram um peso de aproximadamente de 450 pb.

As bandas isoladas (fragmento inteiro contendo gRNA) foram inseridas em tubos para realizar uma reação de ligação dos fragmentos digeridos pela *FokI* ao plasmídeo. Em cada tubo foi adicionado 1 µl do pRGEB32 digerido (50 ng), 1,5 µl dos fragmentos digeridos pela a *FokI* (37,5 ng), 2 µl do Buffer 10x ligase T4, 1µl da ligase T4 e 14,5 µl de dH<sub>2</sub>O, resultando um volume total de 20 µl. Logo, foram colocados em uma estufa, na temperatura de 16°C durante a noite toda.

Para a verificação se houve a inserção dos fragmentos alvos no plasmídeo foi feito uma eletroporação em *Escherichia coli* (*E. coli*) e posteriormente um PCR da colônia eletroporada. Para a eletroporação foi feita uma diluição de 1:10 (colocar 10µl da amostra que se vai fazer a ligação em 90µl de água). Dessa diluição foi colocado 100µl da ligação diluída nas células competentes. Em seguida, depois de 20 minutos foi alocado a célula competente com a ligação na cubeta em um volume de aproximadamente 200µl. Para o choque foi utilizado 1500 volts em 4 segundos em *E. coli*. Depois, foi inserido

400µl de LB líquido, misturado e colocado de volta no tubo que pertencia à célula competente. Posteriormente, foi incubado à 37°C por duas horas. Logo foi centrifugado por 1 minuto e retirado 400µl dos tubos (por causa do LB inserido) e deixou apenas as células competentes. As células competentes foram ressuspensas bem devagar com a pipeta e foi colocado na placa com LB sólido com antibiótico ampicilina (100mg L<sup>-1</sup>), e foi espalhado a bactéria na placa e incubado em estufa com a 37°C.

Foi realizado uma PCR de colônia para verificar se foi inserido o fragmento de interesse no plasmídeo (*CRISPR/Cas9:OsIRO30*), utilizando os *primers* *OsP2032* e *OsP2033*. Foi utilizado também um vetor vazio como controle. E posteriormente, um gel de agarose foi feito para confirmar a inserção. A reação de PCR de colônia foi feita em um ambiente esterilizado, com fluxo ligado e a lamparina acesa. Foi colocado 10µl de LB nos tubos de eppendorf de 1,5 mL, com uma alça de plástico tocou-se na colônia, colocado no eppendorf esfregando no líquido LB e deixou a colônia crescer por uma hora. Centrifugou-se por um minuto e foi colocado nos tubos para a realização de PCR. Para a reação de PCR de colônia foi feito um mix (0,5µl de colônia, 0,5µl de P1 *OsP2032*, 0,5µl de P2 *OsP2033*, 2µl de Buffer 5x, 2µl de BET 5M, 0,5µl de DMSO, 0,4µl de dNTP's, 0,02µl de Taq polimerase, 3,58µl de H<sub>2</sub>O, com um volume total de 20µl). A programação utilizada foi: desnaturação inicial: 5 minutos à 95°C; desnaturação: 30 segundos de 95°C, anelamento: 30 segundos de 52°C, extensão 30 segundos de 72°C, sendo essas etapas repetidas por 41 vezes; extensão final: 10 minutos à 72°C.

As colônias que apresentaram o plasmídeo com o fragmento inserido (*CRISPR/Cas9:OsIRO3*) foram selecionadas, purificadas e enviadas para sequenciar. Para o sequenciamento, foram inseridos 15µl do plasmídeo purificado em tubos especiais, identificados, e enviados para a empresa Eurofins.

No Laboratório de Biologia Molecular, do Centro de Genômica e Fitomelhoramento da Universidade Federal de Pelotas - FAEM/UFPel, o plasmídeo contendo a construção *CRISPR/Cas9:OsIRO3* foi multiplicado. Para isso, o plasmídeo *CRISPR/Cas9:OsIRO3*, assim como o controle pUC, foi inserido via eletroporação (cubeta de 2mm; 25µF; 200 Ω; 2400V) em células

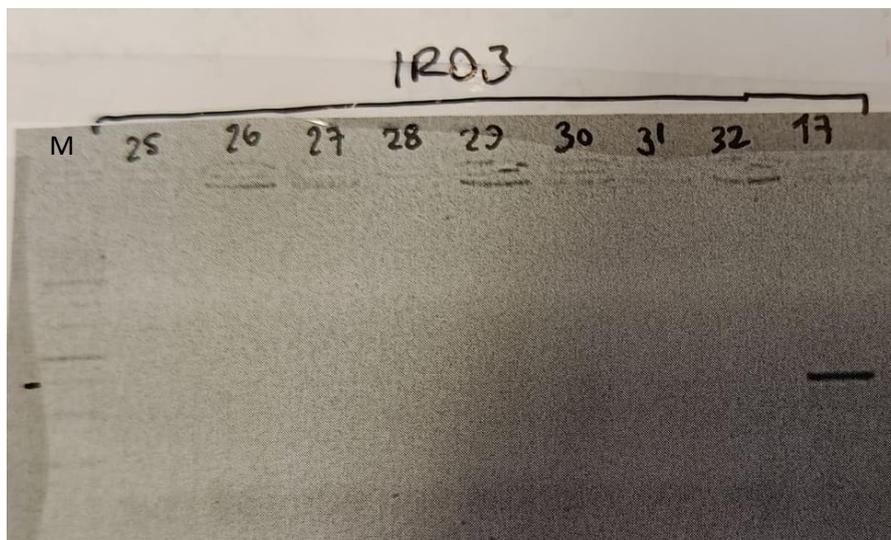
competentes de *E. coli* CEPA TOP10. Posterior ao choque, as células foram mantidas à 37°C durante 1 hora, sob agitação no thermomixer. Em seguida, estas foram estriadas em placas de Petri contendo meio LB sólido acrescido dos antibióticos ampicilina (100mg L<sup>-1</sup>) (pUC) e canamicina (50mg L<sup>-1</sup>) (*CRISPR/Cas9:OsIRO3*). As placas foram incubadas à 37°C durante 24h no shaker (sem agitação), na ausência de luz.

Três colônias individuais foram selecionadas para extração do DNA plasmidial. Para essa etapa, primeiramente foram colocados três pré inóculos, em tubos Falcons de 50mL contendo 5mL de LB, com as colônias (2 a 4) contendo a construção de interesse e um pré inóculo com a colônia contendo o plasmídeo pUC, como controle. O meio LB líquido foi acrescido de ampicilina (100 mg L<sup>-1</sup>) (controle pUC), e canamicina (50mg L<sup>-1</sup>) (*CRISPR/Cas9:OsIRO3*). Essas colônias foram encubadas à 37°C, sob agitação durante 20hs (D.O.=0.7). A extração de DNA plasmidial foi feita com a utilização do kit Miniprep (Kit caseiro).

### 5.3 Resultados e Discussão

#### 5.3.1 PCR de colônia

Conforme esperado, a banda do plasmídeo mais o fragmento inserido apresentou um peso cerca de 500pb (Figura 11).



**Figura 11.** Gel de agarose demonstrando que a banda 17 apresenta o plasmídeo com fragmento de interesse e as outras não amplificaram. Marcador molecular (M): Biotium 1kb ladder

### 5.3.2 Sequenciamento do fragmento

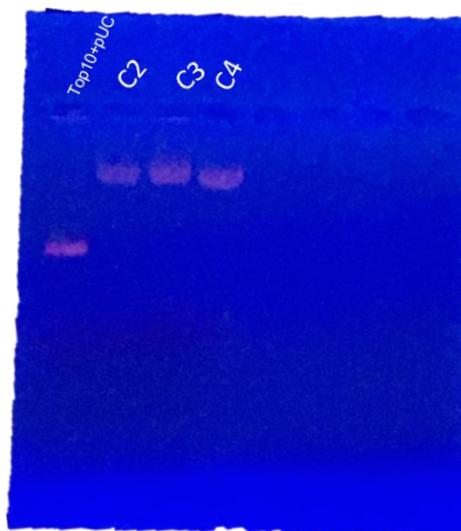
Os resultados do sequenciamento são demonstrados na figura 12.



**Figura 12.** Sequenciamento das colônias de *E. coli* que apresentaram o peso estimado, aproximadamente 500 pb, e com a presença do fragmento de interesse inserido no plasmídeo.

### 5.3.3 Extração de DNA do plasmídeo *CRISPR/Cas9:OsIRO3* multiplicado

A diferença no tamanho do DNA plasmidial do pUC e do *CRISPR/Cas9:OsIRO3* pode ser visualizado na figura 13.



**Figura 13.** Extração de DNA plasmidial. Top10+pUC: *E. coli* com o plasmídeo pUC (controle). C2 a C4: Colônias transformadas com a construção *CRISPR/Cas9:OsIRO3* inserida no plasmídeo.

Com base na figura 13, é possível confirmar que as colônias transformadas apresentam a construção do *CRISPR/Cas9:OsIRO3*. Isso pode ser afirmado devido a diferença dos pesos das bandas do DNA plasmidial da colônia controle (com a inserção do plasmídeo pUC) e das colônias que receberam o plasmídeo (*CRISPR/Cas9:OsIRO3*).

A estratégia CRISPR/Cas9 utilizada para obtenção de genótipos de arroz com maior acúmulo de Fe têm possibilitado o desenvolvimento de pesquisas com resultados promissores. Paralelo ao presente estudo, uma pesquisa com o silenciamento do gene *OsIRO3* foi realizada, e os autores observaram que as plantas editadas obtiveram maior teor de Fe nas raízes quando comparadas as plantas selvagens (controle), em condições de deficiência de Fe (LI et al., 2022). Estudos prévios, também produziram mutantes com perda de função do gene *OsIRO3* (WANG et al., 2020a; WANG et al., 2020b). Wang et al. (2020a) demonstraram que a expressão de genes induzíveis por insuficiência de Fe aumentou nas raízes dos mutantes *iro3*. Por outro lado, Wang et al. (2020b) evidenciaram que o *OsIRO3* regula só o *OsNAS3*, mas não outros genes induzíveis quando a planta está sofrendo em condições por deficiência de Fe.

A continuidade da presente pesquisa, em longo prazo, poderá trazer resultados mais concretos para biofortificação de Fe arroz.

## 6. Considerações Finais

O primeiro estudo demonstrou que os acessos de arroz utilizados no sul do Brasil acumulam baixas concentrações de ferro e zinco no grão, e o processo de polimento reduz ainda mais a quantidade desses elementos. Já a concentração de arsênio no grão da maioria dos genótipos avaliados está acima do limite permitido no País. Além disso, foi observado que há pouca variabilidade genética para essas características.

No segundo estudo foi feito o mapeamento de regiões do genoma responsáveis pelo acúmulo de ferro em grãos integrais de arroz, sendo identificados 13 genes candidatos.

No terceiro estudo foi obtida uma construção para edição de um gene envolvido no metabolismo do ferro em arroz. Essa construção pode ser utilizada para maior acúmulo desse elemento no grão.

Os resultados obtidos nos três estudos podem contribuir com a biofortificação de ferro em arroz.

## 6. Referências Bibliográficas

ABBASPOUR, N.; HURRELL, R.; KELISHADI, R. Review on iron and its importance for human health. **Journal of Research in Medical Science**, v.19, n.2, p. 164-174, 2014.

ABIFARIN, A.O. Grain yield loss due to iron toxicity. West Africa Rice Development Association Technical Newsletter. **Bouaké**, v. 8, p. 1-2, 1988.

ABU-BAKER, N. N.; EYADAT, A. M.; KHAMAISEH, A. M. The impact of nutrition education on knowledge, attitude, and practice regarding iron deficiency anemia among female adolescent students in Jordan. **Heliyon**, v. 7, n. 2, p. e06348, 2021.

AGGARWAL, R.K.; BRAR, D. S.; KHUSH, G. S. Two new genomes in the *Oryza* complex identified on the basis of molecular divergence analysis using total genomic DNA hybridization. **Molecular and General Genetics**, v. 254, p.1-12, 1997.

AHIRWAR, H. K.; MOHABE, S. Medicinal and sacred plants significance of sacred natural sites Raisen District of Madhya Pradesh, India. **Journal of Medicinal Plants Studies**, v. 10, n. 3, p. 55-61, 2022.

AISEN, P.; ENNS, C.; WESSLING-RESNICK, M. Chemistry and biology of eukaryotic iron metabolism. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 33, p. 940–59, 2001.

AKAGI, T.; JUNG, K.; MASUDA, K.; SHIMIZU, K. K. Polyploidy before and after domestication of crop species. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 69, p. 102255, 2022.

ALAGAWANY, M.; ELNESR, S. S.; FARAG, M. R.; TIWARDI, R.; YATOO, M. I.; KARTHIK, K.; MICHALAK, I.; DHAMA, K. Nutritional significance of amino acids, vitamins and minerals as nutraceuticals in poultry production and health—a comprehensive review. **Veterinary quarterly**, v. 41, n. 1, p. 1-29, 2021.

ALI, N.; DATTA, S.K.; DATTA, K. RNA interference in designing transgenic crops. **GM Crops**, v. 1, n. 4, p. 207-213, 2010.

ALI, N.; PAUL, S.; GAYEN, D.; SARKAR, S. N.; DATTA, S. K.; DATTA, K. RNAi mediated down regulation of myo-inositol-3-phosphate synthase to generate low phytate rice. **Rice**, v. 6, n.1, p. 1-12, 2013a.

ALI, N.; PAUL, S.; GAYEN, D.; SARKAR, S.N.; DATTA, K.; DATTA, S. K. Development of low phytate rice by RNAi mediated seed-specific silencing of

inositol 1,3,4,5,6-pentakisphosphate 2-kinase gene (IPK1). **PLoS ONE**, 2013b, v. 8, n. 7, p. 1-12, 2013b.

ALINEJAD, A.; FARSANI, S. F.; BAHMANI, Z.; BARAFRASHTEHPOUR, M.; SARSANGI, V.; KHODADADI, R.; CONTI, G. O.; GOLMOHAMMADI, S.; MORADI, B.; FAKHRI, Y. Evaluation of heavy metals level (arsenic, nickel, mercury and lead) effecting on health in drinking water resource of Kohgiluyeh county using geographic information system (GIS). **International Journal of Medical Research & Health Sciences**, v. 5, p. 233–241, 2016.

ALLEN, L.; DE BENOIST, B.; DARY, O.; HURRELL, R. **Guidelines on food fortification with micronutrients**. Editors: Geneva: WHO and FAO; 2006, p. 236.

ALOMARI, D. Z.; EGGERT, K.; WIRÉN, N. V.; POLLEY, A.; PLIESKE, J.; GANAL, M. W.; LIU, F.; PILLEN, K.; RÖDER, M. S. Whole-Genome Association Mapping and Genomic Prediction for Iron Concentration in Wheat Grains. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 76, p. 1-13, 2019.

ALSANTELY, A.; GUTAKER, R.; RODRÍGUEZ, M. E. N.; ARRIETA-ESPINOZA, G.; FUCHS, E. J.; DE OLIVEIRA, A. C.; TOHME, J.; ZUCCOLO, A.; WING, R. A.; FORNASIERO, A. The International Oryza Map Alignment Project (IOMAP): The Americas - Past achievements and future direction. **Journal of Experimental Botany**, v. 490, p. 1-12, 2022.

ALSHALL, T.; EL-RAMADY, H. Foliar application: from plant nutrition to biofortification. **Environment Biodiversity and Soil Security**, v. 1, p. 71–83, 2017.

ALQUDAH, A. M.; SALLAM, A.; BAENZIGER, P. S.; BÖRNER, A. GWAS: Fast-forwarding gene identification and characterization in temperate Cereals: lessons from Barley – A review. **Journal of Advanced Research**, v. 22, p. 119-135, 2020.

ANDREWS, S.C.; AROSIO, P.; BOTTKER, W.; BRIAT, J.F.; VON DARL, M.; HARRISON, P.M.; LAULHERE, J.P.; LEVI, S.; LOBREAUX, S.; YEWDALL, S.J. Structure, function and evolution of ferritins. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 47, p. 116-174, 1992.

ANTONY, A. C.; VORA, R. M.; KARMARKAR, S. J. The silent tragic reality of *Hidden Hunger*, anaemia, and neural-tube defects (NTDs) in India. **The lancet Regional Health**, v. 6, p. 100071, 2022.

ANURADHA, K.; AGARWAL, S.; RAO, Y. V.; RAO, K. V.; VIRAKTAMATH, B. C.; SARLA, N. Mapping QTLs and candidate genes for iron and zinc concentrations in unpolished rice of Madhukar Swarna RILs. **Gene**, v. 508, n. 2,

p. 233-240, 2012.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2013, **Limites máximos de contaminantes inorgânicos em alimentos**. Acessado em 30 de outubro de 2022. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/>.

ARAKI, M.; ISHII, T. Towards social acceptance of plant breeding by genome editing. **Trends in Plant Science**, v. 20, n. 3, p. 145-149, 2015.

ARNOULD, S.; DELEND, C.; GRIZOT, S.; DESSEAU, C.; PÂQUES, F.; SILVA, G. H. The I-Crel meganuclease and its engineered derivatives: applications from cell modification to gene therapy. **Protein Engineering Design and Selection**, v. 24, n. 1-2, p. 27-31, 2011.

ARTYM, J.; ZIMECKI, M.; KRUZEL, M. Lactoferrin for Prevention and Treatment of Anemia and Inflammation in Pregnant Women: A Comprehensive Review. **Biomedicines**, v. 9, n. 8, p. 898, 2021.

ASKWITH, C.; KAPLAN, J. Iron and copper transport in yeast and its relevance to human disease. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 23, p. 135-8, 1998.

ATWELL, B. J.; WANG, H.; SCAFARO, A. P. (2014) Could abiotic stress tolerance in wild relatives of rice be used to improve *Oryza sativa*? **Plant Science**, v. 215-216, p. 48-58, 2014.

AUNG, M. S.; MASUDA, H.; KOBAYASHI, T.; NAKANISHI, H.; YAMAKAWA, T.; NISHIZAWA, N.K. Iron biofortification of Myanmar rice. **Frontiers in Plant Science**, v. 4, n. 158, p. 1-14, 2013.

ANDRESEN, E.; PEITER, E.; KUPPER, H. Trace metal metabolism in plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 69, p. 909–954, 2018.

ANZALONE, A. V.; RANDOLPH, P. B.; DAVIS, J. R.; SOUSA, A. A.; KOBLAN, L. W.; LEVY, J. M.; CHEN, P. J.; WILSON, C.; NEWBY, G. A.; RAGURAM, A.; LIU, D. R. Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. **Nature**, v. 576, n. 7785, p. 149-157, 2019.

ANZALONE, A. V.; KOBLAN, L. W.; LIU, D. R. Genome editing with CRISPR–Cas nucleases, base editors, transposases and prime editors. **Nature biotechnology**, v. 38, n. 7, p.824-844, 2020.

AWUCHI, C. G.; AWUCHI, C. G. Physiological Effects of Plastic Wastes on the Endocrine System (Bisphenol A, Phthalates, Bisphenol S, PBDEs, TBBPA).

**International Journal of Bioinformatics and Computational Biology**, v. 4, n. 2, p. 11-29, 2019a.

AWUCHI, C. G.; AWUCHI, C. G. Impacts of Plastic Pollution on the Sustainability of Seafood Value Chain and Human Health. **International Journal of Advanced Academic Research**, v. 5, n. 11, p. 46-138, 2019b.

AWUCHI, C. G.; VICTORY, I.; IKECHUKWU, S. A.; ECHETA, C. K. Health Benefits of Micronutrients (Vitamins and Minerals) and their Associated Deficiency Diseases: A Systematic Review. **International Journal of Food Sciences**, v. 3, n. 1, p. 1-32, 2020.

BARRANGOU, R.; FREMAUX, C.; DEVEAU, H.; RICHARDS, M.; BOYAVAL, P.; MOINEAU, S.; ROMERO, D. A.; HORVATH, P. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. **Science**, v. 315, p. 1709-1712, 2007.

BANERJEE, M.; BANERJEE, N.; BHATTACHARJEE, P.; MONDAL, D.; LYTHGOE, P. R.; MARTÍNEZ, M.; PAN, J.; POLYA, D. A.; GIRI, A. K. High arsenic in rice is associated with elevated genotoxic effects in humans. **Scientific Reports**, v. 3, n. 2195, p. 1-8, 2013.

BASHIR, K.; INOUE, H.; NAGASAKA, S.; TAKAHASHI, M.; NAKANISHI, H.; MORI, S.; NISHIZAWA, N. Cloning and characterization of deoxymugineic acid synthase genes from graminaceous plants. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 43, p. 32395-32402, 2006.

BASHIR, K.; ISHIMARU, Y.; NISHIZAWA, N. K. Iron Uptake and Loading into Rice Grains. *Rice*, v. 3, p. 122-130, 2010.

BASHIR, K.; TAKAHASHI, R.; AKHTAR, S.; ISHIMARU, Y.; NAKANISHI, H.; NISHIZAWA, N. K. The knockdown of OsVIT2 and MIT affects iron localization in rice seed. **Rice**, v. 6, n. 31, p. 1-6, 2013a.

BASHIR, K.; NOZOYE, T.; ISHIMARU, Y.; NAKANISHI, H.; NISHIZAWA, N. K. Exploiting new tools for iron bio-fortification of rice. **Biotechnology Advances**, v. 31, p. 1624–1633, 2013b.

BASHIR, K.; RASHEED, S.; KOBAYASHI, T.; SEKI, M.; NISHIZAWA, N. K. Regulating subcellular metal homeostasis: the key to crop improvement. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, n. 1192, p. 1-9, 2016.

BASHIR, K. ISHIMARU, Y.; Challenges and opportunities to regulate mineral transport in rice, **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 86, n. 1, Pages 12–22, 2022.

BEARD, J. L.; DAWSON, H.; PIFIERO, D. J. Iron Metabolism: A Comprehensive Review. **Nutrition Reviews**, Vol. 54, No. 10, p. 295-317, 1996.

BECKER, M.; ASCH, F. Iron toxicity in rice - Conditions and management concepts. **Journal Plant Nutrition Soil Science**, v. 168, p. 558-573, 2005.

BEERLI, R. R.; BARBAS, C. F. Engineering polydactyl zinc-finger transcription factors. **Nature Biotechnology**, v. 20, n. 2, p. 135-141, 2002.

BHAMBHANI, S.; KONDHARE, K. R.; GIRI, A. P.; Advanced genome editing strategies for manipulation of plant specialized metabolites pertaining to biofortification. **Phytochemistry Reviews**, v. 21, p. 81–99, 2022.

BHATTACHARYA, S.; SENGUPTA, S.; KARMAKAR, A.; SARKAR, S. N.; GANGOPADHYAY, G.; DATTA, K.; DATTA, S. K. Genetically engineered rice with appA gene enhanced phosphorus and minerals. **Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology**, v. 28, n. 4, p. 470-482, 2019.

BHULLAR, N. K.; GRUISSEM, W. **Nutritional enhancement of rice for human health: The contribution of biotechnology**. In: *Biotechnology Advances*. Elsevier; 2013, v.31, p. 50-57.

BILALI, H. EL.; O'KANE, G.; CAPONE, R.; BERRY, E. M.; DERNINI, S. Exploring Relationships between Biodiversity and Dietary Diversity in the Mediterranean Region: Preliminary Insights from a Literature Review. **American Journal of Food and Nutrition**, v. 5, n. 1, p. 1-9, 2017.

BINDRABAN, P. S.; DIMKPA, C.; NAGARAJAN, L.; ROY, A.; RABBINGE, R. Revisiting fertilisers and fertilisation strategies for improved nutrient uptake by plants. **Biology and Fertility of Soils**, v. 51, n. 8, p. 897-911, 2015.

BLANCQUAERT, D.; DE STEUR, H.; GELLYNCK, X.; VAN DER STRAETEN, D. Metabolic engineering of micronutrients in crop plants. **Annals of New York Academy of Sciences**, v. 1390, n. 1, p.59-73, 2017.

BLOMBERG, M. R.; SIEGBAHN, P.E.; WIKSTROM, M., Metal-bridging mechanism for O–O bond cleavage in cytochrome C oxidase. **Inorganic Chemical**, v. 42, p. 5231-5243, 2003.

BOLAN, N. S.; MAKINO, T.; KUNHIKRISHNAN, A.; KIM, J.; ISHIKAWA, S.; MURAKAMI, M.; NAIDU, R.; KIRKHAM, M. B. Cadmium Contamination and Its Risk Management in Rice Ecosystems. Em: **Advances in Agronomy**, Academic Press Inc., 2013, 119p, p. 183-273.

BOLLINEDI, H.; YADAV, A. K.; VINOD, K. K.; KRISHNAN, S. G.; BHOWMICK, P. K.; NAGARAJAN, M.; NEERAJA, C. N.; ELLUR, R. K.; SINGH, A. K.; SINGH, A. K. Genome-Wide Association Study Reveals Novel Marker-Trait Associations (MTAs) Governing the Localization of Fe and Zn in the Rice Grain. **Frontiers in Genetics**, v. 11, n. 213, p. 1-13, 2020.

BOONYAVES, K.; GRUISSEM, W.; BHULLAR, N. K. NOD promoter-controlled AtIRT1 expression functions synergistically with NAS and FERRITIN genes to increase iron in rice grains. **Plant Molecular Biology**, v. 90, n. 3, p. 207-215, 2016.

BOONYAVES, K.; WU, T.-Y.; GRUISSEM, W.; BHULLAR, N. K. Enhanced grain iron levels in Rice expressing an iron-regulated metal transporter, nicotianamine synthase, and ferritin gene cassette. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, n. 130, p. 1-11, 2017.

BORTESI, L.; FISCHER, R. The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing and beyond. **Biotechnology Advances**, v. 33, n.1, p. 41–52, 2015.

BOST, M.; HOUDART, S.; OBERLI, M.; KALONJI, E.; HUNEAU, J-F.; MARGARITIS, I. Dietary copper and human health: Current evidence and unresolved issues. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 35, p. 107-115, 2016.

BOUIS, H. E.; HOTZ, C.; MCCLAFFERTY, B.; MEENAKSHI, J. V.; PFEIFFER, W. H. Biofortification: A new tool to reduce micronutrient malnutrition. **Food and Nutrition Bulletin**, v. 32, p. 31–40, 2011.

BOUIS, H. E.; SALTZMAN, A. Improving nutrition through biofortification: A review of evidence from HarvestPlus, 2003 through 2016. **Global Food Security**, v. 12, p. 49- 58, 2017.

BRABIN, B. J.; PREMJI, Z.; VERHOEFF, F. An analysis of anemia and child mortality. **The Journal of Nutrition**, v. 131, n.2, p. 636S-645S, 2001.

BRADBURY, P. J.; ZHANG, Z.; KROON, D. E.; CASSTEVENS, T. M.; RAMDOSS, Y.; BUCKLER, E. S. TASSEL: software for association mapping of complex traits in diverse samples. **BIOINFORMATICS APPLICATIONS**, v. 23, p. 2633-2635, 2007.

BRAR, D. S.; KHUSH, G.S. Alien introgression in rice, **Plant Molecular Biology**, v. 35, n. 1-2, p. 35-47,1997.

BULSKA, E.; WAGNER, B. **Quantitative aspects of inductively coupled plasma mass spectrometry**, *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, Royal Society of London, 2016.

BUSANELLO, C.; VENSKE, E.; STAFEN, C. F.; PEDROLO, A. M.; LUZ, V. K.; PEDRON, T.; PANIZ, F. P.; BATISTA, B. L.; DE MAGALHÃES JUNIOR, A. M.; DE OLIVEIRA, A. C.; PEGORARO, C. et al. Is the genetic variability of elite rice in southern Brazil really disappearing? Is the genetic variability of elite rice in southern Brazil really disappearing? **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 20, n. 2, p. 1-9, 2020.

CAKMAK, I.; KUTMAN, U. B. Agronomic biofortification of cereals with zinc: a review. **European Journal of Soil Science**, v. 69, p. 172-180, 2017.

CALAYUGAN, M. I. C.; FORMANTES, A. K.; AMPARADO, A.; DESCALSOTA-EMPLO, G. I.; NHA, C. T.; INABANGAN-ASILO, M. A.; SWE, Z. M.; HERNANDEZ, J. E.; BORROMEO, T. H.; LALUSIN, A. G.; MENDIORO, M. S.; DIAZ, M. G. Q.; VIÑA, C. B. D.; REINKE, R.; SWAMY, B. P. M. Genetic analysis of agronomic traits and grain iron and zinc concentrations in a doubled haploid population of rice (*Oryza sativa* L.). *Scientific Reports*, v. 10, n. 2283, p. 1-14, 2020.

CAMASCHELLA, C. Iron-deficiency anemia. *The New England Journal of Medicine*, v. 372, 1832-1843, 2015.

CAMARA, A. Y.; WAN, Y.; YU, Y.; WANG, Q.; WANG, K.; LI, H. Effect of endogenous selenium on arsenic uptake and antioxidative enzymes in as-exposed rice seedlings. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 16, n. 3350, p. 1-18, 2019.

CAMARGO, C. E. O. Tolerância de cultivares de arroz em estágio de plântula a diferentes níveis de ferro em solução nutritiva. **Bragantia**, v.43, n.2, p.369-380, 1984.

CANTOS, C.; FRANCISCO, P.; TRIJATMIKO, K. R.; SLAMET-LOEDIN, I.; CHADHAMOHANTY, P. K. Identification of “safe harbor” loci in indica rice genome by harnessing the property of zinc-finger nucleases to induce DNA damage and repair. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, n. 302, p. 1-8, 2014.

CARTER, A.; RACEY, S.; VEUGER, S. The Role of Iron in DNA and Genomic Instability in Cancer, a Target for Iron Chelators That Can Induce ROS. **Applied Sciences**, v. 12, n. 19, p. 10161, 2022.

CARRIJO, A. DE P.; BOTELHO, R. B. A.; AKUTSU, R. DE C. C. DE A.; ZANDONADI, R. P. Is what low-income Brazilians are eating in popular restaurants contributing to promote their health? **Nutrients**, v. 10, n. 414, p. 1-8, 2018.

CESCO, S.; NEUMANN, G.; TOMASI, N.; PINTON, R.; WEISSKOPT, L. Release of plantborne flavonoids into the rhizosphere and their role in plant nutrition. **Plant and Soil**, v. 329, p. 1-25, 2010.

CHAI, Y. N.; SCHACHTMAN, D. P.; Root exudates impact plant performance under abiotic stress. **Trends in Plant Science**, v. 27, n. 1, p. 80-91, 2022.

CHAKRAVARTHI, B. K.; NARAVANENI, R. SSR marker based DNA fingerprinting and diversity study in rice (*Oryza sativa* L.). **African Journal of Biotechnology**, v. 5, p. 684-688, 2006.

CHANDEL, G.; BANERJEE, S.; SEE, S.; MEENA, R.; SHARMA, D. J.; VERULKAR, S. B. Effects of Different Nitrogen Fertilizer Levels and Native Soil Properties on Rice Grain Fe, Zn and Protein Contents. **Rice Science**, v. 17, n. 3, p. 213-227, 2010.

CHANDRARATNA, M. F. **Genetics and Breeding rice**. London: Longmans, 1964, 389 p.

CHANG, T. T. **Origin, Domestication, and Diversification**. In: Smith, C.W. and Dilday, R.H., Eds., *Rice: Origin, History, Technology, and Production*, John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, p. 3-25, 2003.

CHEN, Z.; TANG, Y-T.; ZHOU, C.; XIE, S-T.; XIAO, S.; BAKER, A. J. M.; QIU, R-L. Mechanisms of Fe biofortification and mitigation of Cd accumulation in rice (*Oryza sativa* L.) grown hydroponically with Fe chelate fertilization. **Chemosphere**, v. 175, p. 275-285, 2017.

CHEN, L.; ZHOU, S.; SHI, Y.; WANG, C.; LI, B.; Li, Y.; WU, S. Heavy metals in food crops, soil, and water in the Lihe River Watershed of the Taihu Region and their potential health risks when ingested. **The Science of the Total Environment**, v. 615, p. 141-149, 2018.

CHEN, J.; ZOU, W.; MENG, L.; FAN, X.; XU, G.; YE, G. Advances in the uptake and transport mechanisms and QTLs mapping of cadmium in rice. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 3417, p. 1-17, 2019a.

CHEN, K.; WANG, Y.; ZHANG, R.; ZHANG, H.; GAO, C. CRISPR/Cas genome editing and precision plant breeding in agriculture. **Annual Review of Plant Biology**, v. 70, n. 1, p.667-697, 2019b.

CHEN, P. J.; HUSSMANN, J. A.; YAN, J.; KNIPPING, F.; RAVISANKAR, P.; CHEN, P-F.; CHEN, C.; NELSON, J. W.; NEWBY, G. A.; SAHIN, M.; OSBORN, M. J.; WEISSMAN, J. S.; ADAMSON, B.; LIU, D. R. Enhanced prime editing systems by manipulating cellular determinants of editing outcomes. **Cell**, v. 184, p. 5635-52, 2021.

CHENG, F.; ZHAO, N.; XU, H.; LI, Y.; ZHANG, W.; ZHU, Z.; CHEN, M. Cadmium and lead contamination in japonica rice grains and its variation among the different locations in southeast China. **Science of The Total Environment**, v. 359, n. 1–3, p. 156-166, 2006.

CHOUDHARY, P.; MUSHTAG, M.; SINGH, A. K.; MUKHTAR, S.; SHAH, A. A.; MEHTA, G.; BAKSHI, P. Genome editing using Crispr/Cas system: new era genetic technology in agriculture to boost crop output. **European Journal of the Experimental Biology**, v. 7, n. 3:20, p. 1-7, 2017.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Produção de Arroz**. Disponível em: <http://www.conab.gov.br>. Acesso em 15 de dezembro de 2022.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **A cultura do arroz**. Brasília: Conab, 2015.

CONNORTON, J. M.; BALK, J.; RODRÍGUEZ-CELMA, J. Iron homeostasis in plants – a brief overview. **Metallomics**, v. 9, p. 813-823, 2017a.

CONNORTON, J. M.; JONES, E.R.; RODRIGUEZ-RAMIRO, I.; FAIRWEATHER-TAIT, S.; UAUY, C. BALK, J. Wheat vacuolar iron transporter TaVIT2 transports Fe and Mn and is effective for biofortification. **Plant Physiology**, v. 174, p. 2434-2444, 2017b.

CONNORTON, J. M.; BALK, J. Iron Biofortification of Staple Crops: Lessons and Challenges in Plant Genetics. **Plant & Cell Physiology**, v. 60, n. 7, p. 1447-1456, 2019.

CORGUINHA, A. P. B.; DE SOUZA, G. A.; GONÇALVES, V. C.; DE ANDRADE CARVALHO, C.; DE LIMA, W. E. A.; MARTINS, F. A. D.; YAMANAKA, C. H.; FRANCISCO, E. A. B.; GUILHERME, L. R. G. Assessing arsenic, cadmium, and lead contents in major crops in Brazil for food safety purposes. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 37, p. 143-150, 2015.

CORVALLIS, O. R. **Minerals**. Corvallis, O. R: Micronutrient Information Center, Linus Pauling Institute, Oregon State University, 2018.

CRUZ, C. D. GENES - Software para análise de dados em estatística experimental e em genética quantitativa. **Acta Scientiarum - Agronomy**, v. 35, n. 3, p. 271-276, 2013.

CU, S. T.; WARNOCK, N. I.; PASUGUIN, J.; DINGKUHN, M.; STANGOULIS, J. A high-resolution genome-wide association study of the grain iron and agronomic traits in rice *Oryza sativa* subsp. *indica*. **Scientific Reports**, v. 11, p. 19230, 2021.

CUI, Y.; ZHANG, F.; XU, J.; LI, Z.; XU, S. Mapping quantitative trait loci in selected breeding populations: A segregation distortion approach. **Heredity**, v. 115, p. 538-546, 2015.

CURIE, C.; PANAVIENE, Z.; LOULERGUE, C.; DELLAPORTA, S. L.; BRIAT, J. F.; WALKER, E. L. Maize yellow stripe1 encodes a membrane protein directly involved in Fe(III) uptake. **Nature**, v. 409, p. 346-349, 2001.

CURIE, C.; BRIAT, J. F. Iron transport and signaling in plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 54, p. 183-206, 2003.

DABOUSSI, F.; STODDARD, T. J.; ZHANG, F. **Engineering meganuclease for precise plant genome modification**. In Advances in new technology for targeted modification of plant genomes. Springer, New York, p. 21-38, 2015.

DHALIWAL, S. S.; SHARMA, V.; SHUKLA, A. K.; VERMA, V.; KAUR, M.; SHIVAY, Y. S.; NISAR, S.; GABER, S.; BRESTIC, M.; BAREK, V.; SKALICKY, M.; ONDRISIK, P.; HOSSAIN, A. Biofortification—A Frontier Novel Approach to Enrich Micronutrients in Field Crops to Encounter the Nutritional Security. **Molecules**, v. 27, n.4, p. 1340, 2022.

DE OLIVEIRA, V. F.; BUSANELLO, C.; VIANA, V. E.; STAFEN, C. F.; PEDROLO, A. M.; PANIZ, F. P.; PEDRON, T.; PEREIRA, R. M.; ROSA, S. A.; DE MAGALHÃES JÚNIOR, A. M.; DE OLIVEIRA, A. C.; BATISTA, B. L.; PEGORARO, C. Assessing mineral and toxic elements content in rice grains grown in southern Brazil. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 100, p. 103914, 2021.

DEMŠAR, J.; CURK, T.; ERJAVEC, A.; GORUP, Č.; HOČEVAR, T.; MILUTINOVIČ, M.; MOŽINA, M.; POLAJAR, M.; TOPLAK, M.; STARIČ, A.; ŠTAJDOHAR, M.; UMEK, L.; ŽAGAR, L.; ŽBONTAR, J.; ŽITNIK, M.; ZUPAN, B. Orange: data mining toolbox in python. **Article in Journal of Machine Learning Research**, v. 14, p. 2349-2353, 2013.

DESCALSOTA, G. I. L.; MALLIKARJUNA SWAMY, B. P.; ZAW, H.; INABANGAN-ASILO, M. A.; AMPARADO, A.; MAULEON, R.; CHADHA-MOHANTY, P.; AROCENA, E. C.; RAGHAVAN, C.; LEUNG, H.; HERNANDEZ, J. E.; LALUSIN, A. B. Merlyn S. MENDIORO, M. S.; DIAZ, M. G. Q.; REINKE, R. Genome-Wide Association Mapping in a Rice MAGIC Plus Population Detects QTLs and Genes Useful for Biofortification. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, n. 1347, p. 1-20, 2018.

DESCALSOTA-EMPLEO, G. I.; AMPARADO, A.; INABANGAN-ASILO, M. A.; TESORO, F.; STANGOULIS, J.; REINKE, R.; SWAMY, M. Genetic mapping of QTL for agronomic traits and grain mineral elements in rice. **The Crop Journal**, v. 7, p. 560-572, 2019a.

DESCALSOTA-EMPLEO, G. I.; NORAZIYAH, A. A. S.; NAVEA, I. P.; CHUNG, C.; DWIYANTI, M. S.; LABIOS, R. J. D.; IKMAL, A. M.; JUANILLAS, V. M.; INABANGAN-ASILO, M. A.; AMPARADO, A.; REINKE, R.; CRUZ, C. M. V.; CHIN, J. H.; SWAMY, B. P. M. Genetic dissection of grain nutritional traits and leaf blight resistance in rice. *Genes*, v. 10, n. 30, p. 1-23, 2019b.

DE VALENÇA, A. W.; BAKE, A.; BROUWER, I. D.; GILLER, K. E. **Agronomic biofortification of crops to fight hidden hunger in sub-Saharan Africa**. In: *Global Food Security*. Elsevier v. 12, 2017. p. 8-14.

DEVEAU, H.; GARNEAU, J. E.; MOINEAU, S. CRISPR/Cas System and Its Role in Phage-Bacteria Interactions. **Annual Review of Microbiology**, v. 64, n. 1, p. 475- 493, 2010.

DEY, S.; PAUL, S.; NAG, A.; SENGUPTA, R.; GOPAL, G.; JOSE, J.; XAVIER, J.; MUKHERJEE, A.; KUNDU, R. Iron pulsing, a cost effective and affordable seed invigoration technique for iron bio-fortification and nutritional enrichment of rice grains. **Plant Growth Regulation**, 2023.

DIAMOND, J. Evolution, consequences and future of plant and animal domestication. **Nature**, v. 418, p. 700-707, 2002.

DIXIT, S.; SINGH, U. M.; ABBAI, R.; RAM, T.; SINGH, V. K.; PAUL, A.; VIRK, P. S.; KUMAR, A. Identification of genomic region(s) responsible for high iron and zinc content in rice. **Scientific Reports**, v. 9, n. 8136, p. 1-8, 2019.

DOESTHALE, Y.; DEVARA, S.; RAO, S.; BELAVADY, B. Effect of milling on mineral and trace element composition of raw and parboiled rice. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 30, n. 1, p. 40-46, 1979.

DOS SANTOS, H. G. DOS.; JACOMINE, P. K. T.; DOS ANJOS, L. H. C.; DE OLIVEIRA, V. A.; LUMBRERAS, J. F.; COELHO, M. R.; DE ALMEIDA, J. A.; DE ARAUJO FILHO, J. C.; DE OLIVEIRA, J. B.; CUNHA, T. J. F. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. Empresa Brasileira de Pesquisa

Agropecuária, v. 5ª edição, 2018, 355 p.

DOUDNA, J. A.; CHARPENTIER, E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. **Science**, v. 346, n. 6213, p. 1-11, 2014.

DOMINGUEZ, A. A.; LIM, W. A.; QI, L. S. Beyond editing: Repurposing CRISPRCas9 for precision genome regulation and interrogation. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 17, n. 1, p. 5-15, 2016.

DUEÑAS, C. JR.; SLAMET-LOEDIN, I.; MACOVEI, A. Transcriptomics View over the Germination Landscape in Biofortified Rice. **Genes**, v. 12, n. 12, p. 2013, 2021.

DU, J.; ZENG, D.; WANG, B.; QIAN, Q.; ZHENG, S.; LING, H. Q. Environmental effects on mineral accumulation in rice grains and identification of ecological specific QTLs. **Environmental Geochemistry and Health**, v. 35, n. 2, p.161-170, 2013.

DURAND, E. Y.; PATTERSON, N.; REICH, D.; SLATKIN, M. Testing for ancient admixture between closely related populations. **Molecular biology and evolution**, v. 28, n.8, p. 2239–2252 2011.

EIDE, D.; BRODERUIS, M.; FETT, J.; GUERINOT, M. L. A novel iron regulated metal transporter from plants identified by functional expression in yeast. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, p. 5624–5628, 1996.

ERUVBETINE, D. **Canine Nutrition and Health**. In: A paper presented at the seminar organized by Kensington Pharmaceuticals Nig. Ltd., Lagos, 2003.

ESTRELA, R.; CATE, J. H. D. Energy biotechnology in the CRISPR-Cas9 era. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 38, p. 79-84, 2016.

ESQUINAS-ALCÁZAR, J. Protecting crop genetic diversity for food security: political, ethical and technical challenges. **Nature Review Genetics**, v. 6, p. 946–953, 2005.

ESVELT, K. M.; MALI, P.; BRAFF, J. L.; MOOSBURNER, M.; YAUNG, S. J.; CHURCH, G. M. Orthogonal Cas9 proteins for RNA-guided gene regulation and editing. **Nature Methods**, v. 10, n. 11, p. 1116-1121, 2013.

EURACHEM, **The fitness for purpose of analytical methods : a laboratory guide to method validation and related topics**, v. 2 edition, 2014, 70p.

FAHR, M.; LAPLAZE, L.; BENDAOU, N.; HOCHER, V.; MZIBRI, M. E.; BOGUSZ, D.; SMOUNI, A. et al. Effect of lead on root growth, *Frontiers in Plant Science*. **Frontiers Research Foundation**, v. 4, n. 175, p. 1-7, 2013.

FAKHRI, Y.; ATAMALEKI, A.; ASADI, A.; GHASEMI, S. M.; MOUSAVI KHANEGHAH, A. Bioaccumulation of potentially toxic elements (PTEs) in muscle *Tilapia* spp fish: A systematic review, meta-analysis, and non-carcinogenic risk assessment. **Toxin Reviews**, p. 1-11, 2019a.

FAKHRI, Y.; ABTAHI, M.; ATAMALEKI, A.; RAOOFI, A.; ATABATI, H.; ASADI, A.; MIRI, A.; SHAMLOO, E.; ALINEJAD, A.; KERAMATI, H.; KHANEGHAH, A. M. The concentration of potentially toxic elements (PTEs) in honey: A global systematic review and meta-analysis and risk assessment. **Trends in Food Science & Technology**, v. 91, p. 498-506, 2019b.

FAKHRI, Y.; KHANEGHAH, A. M.; CONTI, G. O.; FERRANTE, M.; KHEZRI, A.; DARVISHI, A.; AHMADI, M.; HASANZADEH, V.; RAHIMIZADEH, A.; KERAMATI, H.; MORADI, B.; AMANIDAZ, N. Probabilistic risk assessment (Monte Carlo simulation method) of Pb and Cd in the onion bulb (*Allium cepa*) and soil of Iran. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, p. 30894-30906, 2018.

FÃO, N.; NASCIMENTO, S.; DE LA CRUZ, A. H.; CALDERON, D.; ROCHA, R.; SAINT´PIERRE, T.; GIODA, A.; THIESEN, F. V.; BRUCKER, N.; EMANUELLI, T.; GARCIA, S. C. Estimation of total arsenic contamination and exposure in Brazilian rice and infant cereals. **Drug and Chemical Toxicology**, v. 44, n. 4, p. 400-408, 2021.

FENG, X.; YOSHIDA, K.T. Molecular approaches for producing low-phytic-acid grains in rice. **Plant Biotechnology**, v. 21, n. 3, p. 183-189, 2004.

FIAZ, S.; AHMAD, S.; NOOR, M.A.; NOOR, M.A.; WANG, X.; YOUNAS, A.; RIAZ, A.; RIAZ, A.; ALI, F. Applications of the CRISPR/Cas9 system for rice grain quality improvement: Perspectives and opportunities. **International Journal of Molecular Science**, v.20, n. 888, p.1-18, 2019.

FITZGERALD, M. A.; MCCOUCH, S. R.; HALL, R. D. Not just a grain of rice: the quest for quality. **Trends in Plant Science**, v. 14, n. 3, p. 133-139, 2009.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **FAO Rice Market Monitor**, December 2014, Volume XVII - Issue No. 4. Disponível em: <http://www.fao.org/3/a-i4294e.pdf>. Acesso em: 29 de abril de 2020.

FORNASIERO, A.; WING, R. A.; RONALD, P. Rice domestication. **Current Biology**, v. 32, n. 1, p.R20-R24, 2022.

FULLER, D. Q.; SATO, Y.-I. CASTILLO, C.; QIN, L.; WEISSKOPF, R.; KINGWELL-BANHAM, E. J.; SONG, J.; AHN, S. -M.; ETTEN, J. V. Consilience of genetics and archaeobotany in the entangled history of rice. **Archaeological and Anthropological Sciences**, v. 2, p. 115-131, 2010.

GAO, F.; DUBOS, C. Transcriptional integration of plant responses to iron availability. **Journal of Experimental Botany**, v. 72, n. 6, p. 2056-2070, 2021.

GARCÍA-BAÑUELOS, M. L.; SIDA-ARREOLA, J. P.; Biofortification - Promising approach to increasing the content of iron and zinc in staple food crops. **Journal of Elementology**, v. 19, n. 3, p. 865-888, 2014.

GARCIA-OLIVEIRA, A. L.; TAN, L.; FU, Y.; SUN, C. Genetic identification of quantitative trait loci for contents of mineral nutrients in rice grain. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 51, n. 1, p. 84–92, 2009.

GARG, M.; SHARMA, N.; SHARMA, S.; KAPOOR, P.; KUMAR, A.; CHUNDURI, V.; ARORA, P. Biofortified crops generated by breeding, agronomy, and transgenic approaches are improving lives of millions of people around the world. **Frontiers in Nutrition**, v. 5, n. 12, p. 1-33, 2018.

GASIUNAS, G.; BARRANGOU, R.; HORVATH, P.; SIKSNYS, V. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 39, p. E2579–E2586, 2012.

GAUTAM, C. K.; TSAI, H-H.; SCHMIDT, W.; IRONMAN tunes responses to iron deficiency in concert with environmental Ph. **Plant Physiology**, v. 187, n. 3, p. 1728-1745, 2021.

GLASZMANN, J. C. Isozymes and classification of Asian rice varieties. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 74, p. 21-30, 1987.

GE, S.; SANG, T.; LU, B-R.; HONG, D-Y. Phylogeny of rice genomes with emphasis on origins of allotetraploid species. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.96, n. 25, p. 14400-14405, 1999.

GE, S.; LI, A.; LU, B-R.; ZHANG, S-Z.; HONG, D-Y.; A phylogeny of the rice tribe Oryzeae (Poaceae) based on *matK* sequence data. **American Journal of Botany**, v. 89, n. 12, p. 1967-1972, 2002.

GEDFIE, S.; GETAWA, S.; MELKU, M. Prevalence and Associated Factors of Iron Deficiency and Iron Deficiency Anemia Among Under-5 Children: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Global Pediatric Health**, v. 9, p. 1-13, 2022.

GILL, P. K.; KAUR, K.; SINGH, A.; KAUR, M. Soil Characteristic Features and Availability of Nutrients Under Various Fertilization Strategies in Wheat. **International Journal of Modern Developments in Engineering and Science**, v. 1, n. 7, p. 1-6. 2022.

GREGORIO, G. B.; SENADHIRA, D.; HTUT, H.; GRAHAM, R. D. Breeding for trace mineral density in rice. **Food and Nutrition Bulletin**, v. 21, n. 4, p.382-386, 2000.

GRIECO, M.; SCHMIDT, M.; WARNEMÜNDER, S.; BACKHAUS, A.; KLÜCK, H-C.; GARIBAY, A.; MOYA, Y. A. T.; JOZEFOWICZ, A. M.; MOCK, H-P.; SEIFFERT, U.; MAURER, A.; PILLEN, K. Dynamics and genetic regulation of leaf nutrient concentration in barley based on hyperspectral imaging and machine learning. **Plant Science**, v. 315, p. 111123, 2022.

GORDON, N. Iron deficiency and the intellect. **Brain and Development**, v. 25, n.1, p. 3-8, 2003.

GOTO, F.; YOSHIHARA, T.; SHIGEMOTO, N.; TOKI, S.; TAKAIWA, F. Iron fortification of rice seed by the soybean ferritin gene. **Nature Biotechnology**, v. 17, n. 3, p. 282–286, 1999.

GROSS, B.; ZHAO, Z. Archaeological and genetic insights into the origins of domesticated rice. **Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n.17, p. 6190-6197, 2014.

GUAN J.; YEH C.; LIN Y.; KE Y.; CHEN M.; YOU J.; LIU Y.; LU C.; WU S.; LIN C.; A 9 bp cis-element in the promoters of class I small heat shock protein genes on chromosome 3 in rice mediates L-azetidine-2-carboxylic acid and heat shock responses. **Journal of Experimental Botany**, v. 61, n. 15, p.4249–4261, 2010.

GUERINOT, M. L. Microbial iron transport. **Annual Review Microbiology**, v. 48, p. 743-772, 1994a.

GUERINOT, M. L.; Yi, Y. Iron: nutritious, noxious, and not readily available. **Plant Physiology**, v. 104, p. 815-820, 1994b.

GUGGENHEIM, K. Y. Chlorosis: The rise and disappearance of a nutritional disease. **The Journal of Nutrition**, v. 125, n. 7, p. 1822-1825, 1995.

GUHA, T. K.; WAI, A.; HAUSNER, G. Programmable genome editing tools and their regulation for efficient genome engineering. **Computational Structural and Biotechnology Journal**, v. 15, p. 146-160, 2017.

GUO, Y-L.; GE, S. Molecular phylogeny of Oryzeae (Poaceae) based on DNA sequences from chloroplast, mitochondrial, and nuclear genome. **American Journal of Botany**, v. 92, n.9, p.1548-1558, 2005.

GUO, J.; GAJ, T.; BARBAS, C. F. Directed Evolution of an Enhanced and Highly efficient FokI cleavage domain for zinc finger nucleases. **Journal of Molecular Biology**, v. 400, n. 1, p. 96-107, 2010.

GUTAKER, R. M.; GROEN, S. C.; BELLIS, E. S.; CHOI, J. Y.; PIRES, I. S.; BOCINSKY, R. K.; SLAYTON, E. R.; WILKINS, O.; CASTILLO, C. C.; NEGRÃO, S.; OLIVEIRA, N. M.; FULLER, D. Q.; GUEDES, J. A. D'A.; LASKY, J. R.; PURUGGANAN, M. D.; Genomic history and ecology of the geographic spread of rice. **Nature Plants**, v. 6, p. 492–502, 2020.

HAN, B.; HUANG, X. Sequencing-based genome-wide association study in rice. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 16, n. 2, p. 133-138, 2013.

HAAS, J. D.; BEARD, J. L.; MURRAY-KOLB, L. E.; DEL MUNDO, A. M.; FELIX, A.; GREGORIO, G. B. Iron biofortified rice improves the iron stores of nonanemic Filipino women. **The Journal of Nutrition**, v. 135, n. 12, p. 2823–2830, 2005.

HAEUSSLER M.; JOLY J. L.; When needles look like hay: How to find tissuespecific enhancers in model organism genomes. **Developmental Biology**, v.350, p.239-254, 2010.

HANSEN, T. H.; LAURSEN, K. H.; PERSSON, D. P.; PEDAS, P.; HUSTED, S.; SCHJOERRING, J. K. et al. Micro-scaled high-throughput digestion of plant tissue samples for multi-elemental analysis. **Plant Methods**, v. 5, n. 12, p. 1-12, 2009.

HANSEN, T. H.; LOMBI, E.; FITZGERALD, M.; LAURSEN, K. H.; FRYDENVANG, J.; HUSTED, S.; BOUALAPHANH, C.; RESURRECCION, A.; HOWARD, D. L.; DE JONGE, M. D.; PATERSON, D.; SCHJOERRING, J. K. Losses of essential mineral nutrients by polishing of rice differ among genotypes due to contrasting grain hardness and mineral distribution. **Journal of Cereal Science**, v. 56, n. 2, p. 307-315, 2012.

HASSAN, F. I.; NIAZ, K.; KHAN, F.; MAQBOOL, F.; ABDOLLAHI, M. The relation between rice consumption, arsenic contamination, and prevalence of diabetes in South Asia. **EXCLI Journal**, v. 16, p. 1132-1143, 2017.

HAYNES, R. J.; NAIDU, R. Influence of lime, fertilizer and manure applications on soil organic matter content and soil physical conditions: A review. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, v. 51, n. 2, p. 123-137, 1998.

HE, S.-L.; HO, S.-L. Functional Characterization of a WD-Repeat Protein Gene (*OsWD1*) in Rice. **American Journal of Agriculture and Forestry**, v. 6, n. 2, p. 18-27, 2018.

HEEB, S.; ITOH, Y.; NISHIJYO, T.; SCHNIDER, U.; KEEL, C.; WADE, J.; WALSH, U.; O'GARA, F.; HAAS, D. Small, stable shuttle vectors based on the minimal pVS1 replicon for use in gram-negative, plant-associated bacteria. **Molecular Plant Microbiome Interactions**, v. 13, n. 2, p. 232-237, 2000.

HEFFERON, K. L. Can biofortified crops help attain food security. **Current Molecular Biology Reports**, v. 2, p. 180-185, 2016.

HEMAMALINI, G. S.; SHASHIDHAR, H. E.; HITTALMANI, S. Molecular marker assisted tagging of morphological and physiological traits under two contrasting moisture regimes at peak vegetative stage in rice (*Oryza sativa* L.) **Euphytica**, v. 112, p. 69-78, 2000.

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

HESHMATI, A.; SADATI, R.; GHAVAMI, M.; KHANEGHAH, A. M. The concentration of potentially toxic elements (PTEs) in muscle tissue of farmed Iranian rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), feed, and water samples collected from the west of Iran: A risk assessment study. **Environmental Science and Pollution Research**, p. 1-10, 2019.

HETTIARACHCHI, M.; HILMERS, D. C.; LIYANAGE, C.; ABRAMS, S. A. Na<sub>2</sub>EDTA Enhances the Absorption of Iron and Zinc from Fortified Rice Flour in Sri Lankan Children. **The Journal of Nutrition**, v. 134, n. 11, p. 3031-3036, 2004.

HIGUCHI, K.; SUZUKI, K.; NAKANISHI, H.; YAMAGUCHI, H.; NISHIZAWA, N. MORI, S. Cloning of nicotianamine synthase genes, novel genes involved in the biosynthesis of phyto siderophores. **Plant Physiology**, v. 119, p. 471-479, 1999.

HINO, K.; YANATORI, I.; HARA, Y.; NISHINA, S. Iron and liver cancer: an inseparable connection. **The FEBS Journal**, v. 289, p. 7810-7829, 2022.

HSIEH, H.; LIU, W.; HUANG, P.C. A novel stress-inducible metallothionein-like gene from rice. **Plant Molecular Biology**, v. 28, n.3, p. 381-389, 1995.

HUANG, M.; XIE, F. M.; CHEN, L. Y.; ZHAO, X. Q.; JOJEE, L.; MADONNA, D. 2010. Comparative analysis of genetic diversity and structure in rice using ILP and SSR markers. **Rice Science**, v. 17, p. 257–268, 2010.

HUANG, Y.; SUN, C.; MIN, J.; CHEN, Y.; TONG, C.; BAO, J. Association Mapping of Quantitative Trait Loci for Mineral Element Contents in Whole Grain Rice (*Oryza sativa* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 50, p. 10885-10892, 2015.

HUANG, X. Y.; SALT, D. E. Plant ionomics: from elemental profiling to environmental adaptation. **Molecular Plant**, v. 9, p. 787-797, 2016.

HU, P.; HUANG, J.; OUYANG, Y.; WU, L.; SONG, J.; WANG, S.; LI, Z.; HAN, C.; ZHOU, L.; HUANG, Y.; LUO, Y.; CHRISTIE, P. et al. Water management affects arsenic and cadmium accumulation in different rice cultivars. **Environmental Geochemistry and Health**, v. 35, n; 6, p. 767-778, 2013.

HU, B. L; HUANG, D. R.; XIAO, Y. Q.; FAN, Y. Y.; CHEN, D. Z.; ZHUANG, J. Y. Mapping QTLs for mineral element contents in brown and milled rice using an *Oryza sativa* × *O. rufipogon* backcross inbred line population. **Cereal Research Communications**, v. 44, n. 1, p. 57-68, 2016.

HURRELL, R. F. Ensuring the Efficacious Iron Fortification of Foods: A Tale of Two Barriers. **Nutrients**, v. 14, n. 8, p. 1609, 2022.

HUGHES, E. R. **Human iron metabolism**. In: Sigel H, ed. Metal Ions in Biological Systems. Iron in Model and Natural Compounds. New York: Marcel Dekker, 1977.

HURRELL, R.; RANUM, P.; DE PEE, S.; BIEBINGER, R.; HULTHEN L; JOHNSON, W.; LYNCH, S. Revised recommendations for the iron fortification of wheat flour and an evaluation of the expected impact of current national wheat flour fortification programs. **Food and Nutrition Bulletin**, v. 31, n. 1, p. S7–S21, 2010.

HURRELL, R. EGLI, L. Iron bioavailability and dietary reference values. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 91, n. 5, p. 1461S–1467S, 2010.

INDURKAR, A. B.; MAJGAHE, S. K.; SAHU, V. K.; VISHWAKARMA, A.; PREMI, V.; SHIRVASTATVA, P. Identification, Characterization and Mapping of QTLs related to Grain Fe, Zn and Protein Contents in Rice (*Oryza sativa* L.). **Electronic Journal of Plant Breeders**, v. 6, n. 4, p. 1059-1068, 2015.

INMETRO. INDMTEQ, Orientação sobre validação de métodos analíticos, **Inmetro**, 2010.

INOUE, H.; HIGUCHI, K.; TAKAHASHI, M.; NAKANISHI, H.; MORI, S.; NISHIZAWA, N. K. Three rice nicotianamine synthase genes, *OsNAS1*, *OsNAS2*, and *OsNAS3* are expressed in cells involved in long-distance transport of iron and differentially regulated by iron. **The Plant Journal: for cell and molecular biology**, v. 36, n. 3, p. 366-381, 2003.

INOUE, H.; KOBAYASHI, T.; NOZOYE, T.; TAKAHASHI, M.; KAKEI, Y.; SUZUKI, K.; NAKAZONO, M.; NAKANISHI, H.; MORI, S.; NISHIZAWA, N. K. Rice *OsYSL15* is an iron-regulated Iron(III)-Deoxymugineic Acid Transporter expressed in the roots and is essential for iron uptake in early growth of the seedlings. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, p. 3470-3479, 2009.

IOM - Institute of Medicine (US) Panel on Micronutrients. **Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc**, National Academies Press, 2001.

ISHIMARU, Y.; SUZUKI, M.; TSUKAMOTO, T.; SUZUKI, K.; NAKAZONO, M.; KOBAYASHI, T.; WADA, Y.; WATANABE, S.; MATSUHASHI, S.; TAKAHASHI, M.; NAKANISHI, H.; MORI, S.; NISHIZAWA, N. Rice plants take up iron as an  $Fe^{3+}$ -phytosiderophore and as  $Fe^{2+}$ . **The Plant Journal**, v. 45, n. 3, p. 335-346, 2006.

ISHIMARU, Y.; MASUDA, H.; BASHIR, K.; INOUE, H.; TSUKAMOTO, T.; TAKAHASHI, M.; NAKANISHI, H.; AOKI, N.; HIROSE, T.; OHSUGI, R.; NISHIZAWA, N. K. Rice metal nicotianamine transporter, *OsYSL2*, is required for the long-distance transport of iron and manganese. **The Plant Journal**, v. 62, n. 3 p. 379–390, 2010.

ISHIMARU, Y.; KAKEI, Y.; SHIMO, H.; BASHIR, K.; SATO, Y.; SATO, Y.; UOZUMI, N.; NAKANISHI, H.; NISHIZAWA, N. K. A rice phenolic efflux transporter is essential for solubilizing precipitated apoplasmic iron in the plant stele. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 28, p. 24649–24655, 2011.

ISHIMARU, Y.; TAKAHASHI, R.; BASHIR, K.; SHIMO, H.; SENOURA, T.; SUGIMOTO, K.; ONO, K.; YANO, M.; ISHIKAWA, S.; ARAO, T.; NAKANISHI, H.; NISHIZAWA, N. K. Characterizing the role of rice *NRAMP5* in Manganese, Iron and Cadmium Transport. **Scientific Reports**, v. 2, n. 286, p. 1-8, 2012.

ISLAM, S.; RAHMAN, M. M.; ISLAM, M. R.; NAIDU, R. Arsenic accumulation in rice: Consequences of rice genotypes and management practices to reduce

human health risk. **Environment International**, v. 96, p. 139-155, 2016.

ISMAILA, S.; TANKO, M. Exploring relative deprivation theory in the rice industry: Planting for Food and Jobs (PFJ) in northern Ghana. **Technology in Society**, v. 65, p.101556, 2021.

ITAI, R. N., OGO, Y.; KOBAYASHI, T.; NAKANISHI, H.; NISHIZAWA, N. K. Rice genes involved in phytosiderophore biosynthesis are synchronously regulated during the early stages of iron deficiency in roots. **Rice**, v. 6, n. 16, p. 1-13, 2013.

JACQUEMIN, J.; BHATIA, D.; SINGH, K.; WING, R. A. The International Oryza Map Alignment Project: Development of a genus-wide comparative genomics platform to help solve the 9 billion-people question. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 16, n.2, p. 147-156, 2013.

JAIN, B. T.; SARIAL, A. K.; PRASHANT, K.; Stability analysis utilizing AMMI model and regression analysis for grain yield of Basmati rice (*Oryza sativa* L.) genotypes. **JEBAS**, v. 6, n. 3, p. 522-530, 2018.

JAIN, B.; SARIAL, A.; KAUSHIK, P. Understanding G x E Interaction of Elite Basmati Rice (*Oryza sativa* L.) Genotypes under North Indian Conditions Using Stability Models. **Applied Ecology and Environmental Research**, v. 17, n. 3., p. 5863-5885, 2019.

JASIM ALJUMAILI, S.; RAFII, M. Y.; LATIF, M. A.; SAKIMIN, S. Z.; AROLU, I. W.; MIAH, G. Genetic Diversity of Aromatic Rice Germplasm Revealed by SSR Markers. **BioMed Research International**, v. 2018, p. 1-12, 2018.

JENG, T. L.; LIN, Y. W.; WANG, C. S.; SUNG, J. M. Comparisons and selection of rice mutants with high iron and zinc contents in their polished grains that were mutated from the indica type cultivar IR64. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 28, n. 2, p. 149-154, 2012.

JIA, L.; WU, Z.; HAO, X.; CARRIE, C.; ZHENG, L.; WHELAN, J.; WU, Y.; WANG, S.; WU, P.; MAO, C. Identification of a novel mitochondrial protein, short postembryonic roots 1 (*SPR1*), involved in root development and iron homeostasis in *Oryza sativa*. **New Phytologist**, v. 189, p. 843-855, 2011.

JIANG, W.; BIKARD, D.; COX, D.; ZHANG, F.; MARRAFFINI, L. A. RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems. **Nature Biotechnology**, v. 31, n. 3, p. 233-239, 2013.

JIANG, L.; STROBBE, S.; VAN DER STRAETEN, D.; ZHANG, C. Regulation of Plant Vitamin Metabolism: Backbone of Biofortification for the Alleviation of Hidden Hunger. **Molecular Plant**, v. 14, p. 40–60, 2021.

JINEK, M.; CHYLINSKI, K.; FONFARA, I.; HAUER, M.; DOUDNA, J. A.; CHARPENTIER, E. A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. **Science**, v. 337, n. 6096, p. 816-821, 2012.

JOHNSON, A. A. T.; KYRIACOU, B.; CALLAHAN, D. L.; CARRUTHERS, L.; STANGOULIS, J.; LOMBI, E.; TESTER, M. Constitutive overexpression of the OsNAS gene family reveals single-gene strategies for effective iron and zinc-biofortification of Rice endosperm. **PLoS ONE**, v. 6, n. 9, p. 1-11, 2011.

JUNG, Y. J.; NOGOY, F. M.; LEE, S. K.; CHO, Y. G.; KANG, K. K. Application of ZFN for site directed mutagenesis of rice *SS/Va* gene. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v.23, n. 1, p.108-115, 2018.

KAIRAM, B. S.; SRAN, R. S. Use of crop wild relatives for biotic and abiotic stress tolerance in rice: A review. **The Pharma Innovation Journal**, v. 11, n. 6, p. 1503-1507, 2022.

KAR, S.; PANDA, S. K. Iron Homeostasis in Rice: Deficit and Excess. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, n. 2, p. 227-235, 2020.

KARIMAH, A. Z.; SISWOYO, T, S.; KIM, K. M.; UBAIDILLAH, M. Genetic Diversity of Rice Germplasm (*Oryza Sativa* L.) of Java Island, Indonesia. **Journal of Crop Science and Biotechnology**, v. 24, n. 1, v. 93-101, 2021.

KARMAKAR, A.; BHATTACHARYA, S.; SENGUPTA, S.; ALI, N.; SARKAR, S. N.; DATTA, K.; DATTA, S.K. RNAi-mediated silencing of ITPK gene reduces phytic acid content, alters transcripts of phytic acid biosynthetic genes, and modulates mineral distribution in rice seeds. **Rice Science**, v. 27, n. 4, p. 315-328, 2020.

KATO, L. S.; FERNANDES, E. A. DE N.; RAAB, A.; BACCHI, M. A.; FELDMANN, J. Arsenic and cadmium contents in Brazilian rice from different origins can vary more than two orders of magnitude. **Food Chemistry**, v. 286, p. 644-650, 2019.

KASOTE, D.; SREENIVASULU, N.; ACUIN, C.; REGINA, A. Enhancing health benefits of milled rice: current status and future perspectives. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, p. 1-21, 2021.

KELLOGG, E. A. The evolutionary history of Ehrhartoideae, Oryzeae, and *Oryza*. **Rice**, v. 2, n.1, p. 1-14, 2009.

KERKEB, L.; CONNOLLY, E. L. **Iron transport and metabolism in plants**. In Genetic Engineering, ed. J. K., S. Springer, p. 119-140, 2006.

KHAN, M. U.; MALIK, R. N.; MUHAMMAD, S. Human health risk from heavy metal via food crops consumption with wastewater irrigation practices in Pakistan. **Chemosphere**, v. 93, p. 2230-2238, 2013.

KHALEKUZZAMAN, M.; DATTA, K.; OLIVA, N.; ALAM, M.; DATTA, S. Stable integration, expression and inheritance of the ferritin gene in transgenic elite indica rice cultivar BR29 with enhanced iron level in the endosperm. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 5, n.1, p. 26–31, 2006.

KHANEGHAH, A. M.; FAKHRIB, Y.; NEMATOLLAHIC, A.; PIRHADID, M. Potentially toxic elements (PTEs) in cereal-based foods: A systematic review and meta-analysis. **Trends in Food Science & Technology**, v. 96, p. 30-44, 2020.

KHATODIA, S.; BHATOTIA, K.; PASSRICHA, N.; KHURANA, S. M. P.; TUTEJA, N. The CRISPR/Cas Genome-Editing Tool: Application in Improvement of Crops. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, n. 506, p. 1-13, 2016.

KIELISZEK, M.; BŁAZEJAK, S. Current knowledge on the importance of selenium in food for living organisms: A review. **Molecules**, v. 21, n. 5, p. 1-16, 2016.

KIM, Y. G., CHA, J., CHANDRASEGARAN, S. Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 3, p. 1156-1160, 1996.

KIM, S. A.; PUNSHON, T.; LANZIROTTI, A.; LI, L.; ALONSO, J. M.; ECKER, J. R.; KAPLAN, J.; GUERINOT, M.L. Localization of iron in Arabidopsis seed requires the vacuolar membrane transporter VIT1. **Science**, v. 314, n. 5803, p. 1295-1298, 2006.

KIM, S. A.; GUERINOT, M. L. Mining iron: Iron uptake and transport in plants. **FEBS Letters**, v. 581, n.12, p. 2273-2280, 2007.

KIM, S. I.; ANDAYA, C. B.; NEWMAN, J. W.; GOYAL, S. S.; TAI, T. H. Isolation and characterization of a low phytic acid rice mutant reveals a mutation in the rice orthologue of maize MIK. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 117, p.

1291–1301, 2008.

KIM, J. Y.; KIM, W-II.; KUNHIKRISHNAN, A.; KANG, D-W.; KIM, D-H.; LEE, Y-J.; KIM, Y-J.; KIM, C-T. Determination of arsenic species in rice grains using HPLC-ICP-MS. **Food Science and Biotechnology**, v. 22, n. 6, p. 1509-1513, 2013.

KIRAN, A.; WAKEEL, A.; MAHMOOD, K.; MUBARAKA, R.; HAFSA.; HAEFELE, S. M. Biofortification of Staple Crops to Alleviate Human Malnutrition: Contributions and Potential in Developing Countries. **Agronomy**, v. 12, n. 2, p. 452, 2022.

KOBAYASHI, T.; NAKANISHI, H.; TAKAHASHI, M.; KAWASAKI, S.; NISHIZAWA, N.; MORI, S. In vivo evidence that *Ids3* from *Hordeum vulgare* encodes a dioxygenase that converts 20-deoxymugineic acid to mugineic acid in transgenic rice. **Planta**, v. 212, n. 5-6, p. 864–871, 2001.

KOBAYASHI, T.; SUZUKI, M.; INOUE, H.; ITAI, R. N.; TAKAHASHI, M.; NAKANISHI, H.; MORI, S.; NISHIZAWA, N. K. Expression of iron-acquisition-related genes in iron-deficient rice is coordinately induced by partially conserved iron-deficiency responsive elements. **Journal of Experimental Botany**, v. 56, n.415, p. 1305-1316, 2005.

KOBAYASHI, T.; OGO, Y.; ITAI, R. N.; NAKANISHI, H.; TAKAHASHI, M.; MORI, S.; NISHIZAWA, N. K. The transcription factor IDEF1 regulates the response to and tolerance of iron deficiency in plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 48, p. 19150-19155, 2007.

KOBAYASHI, T.; ITAI, R. N.; OGO, Y.; KAKEI, Y.; NAKANISHI, H.; TAKAHASHI, M.; NISHIZAWA, N. K. The rice transcription factor IDEF1 is essential for the early response to iron deficiency, and induces vegetative expression of late embryogenesis abundant genes. **The Plant Journal**, v. 60, n. 6, p. 948-961, 2009.

KOBAYASHI, T.; NISHIZAWA, N. K. Iron uptake, translocation, and regulation in higher plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 63, p. 131-152, 2012.

KOBAYASHI, T.; NOZOYE, T.; NISHIZAWA N. K. Iron transport and its regulation in plants. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 133, p.11-20, 2019.

KOÇ, E.; KARAYIĞIT, B. Assessment of Biofortification Approaches Used to Improve Micronutrient-Dense Plants That Are a Sustainable Solution to Combat Hidden Hunger. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v. 22, p. 475–

500, 2022.

KOIKE, S.; INOUE, H.; MIZUNO, D.; TAKAHASHI, M.; NAKANISHI, H.; MORI, S.; NISHIZAWA, N.K. OsYSL2 is a rice metal-nicotianamine transporter that is regulated by iron and expressed in the phloem. **The Plant Journal**, v. 39, n. 3, p. 415-424, 2004.

KOK, A. D.; YOON, L. L.; SEKELI, R.; YEONG, W. C.; YUSOF, Z.N.B.; SONG, L. K. **Iron biofortification of rice: Progress and prospects**. Rice Crop—Current Developments; In: SAHA, F., KHAN, Z. H., IQBAL, A. (Eds.), Intech Open: London, UK, 2018, v. 3, pp. 25–44.

KREŻEŁ, A.; MARET, W. The biological inorganic chemistry of zinc ions. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 611, p. 3–19, 2016.

KUMAR, J.; JAIN, S.; JAIN, R. K. Linkage Mapping for Grain Iron and Zinc Content in F2 Population Derived from the Cross between PAU201 and Palman 579 in Rice (*Oryza sativa* L.). **Cereal Research Communications**, v. 42, n. 3, pp. 389-400, 2014.

KUMAR, A.; LAL, M. K.; KAR, S. S.; NAYAK, L.; NGANGKHAM, U.; SAMANTARAY, S.; SHARMA, S. G. Bioavailability of iron and zinc as affected by phytic acid content in rice grain. **Journal of Food Biochemistry**, v. 41, n. 6, p. e12413, 2017.

KUMAR, N.; JAIN, R. K.; CHOWDHURY, V. K. Linkage mapping of QTLs for grain minerals (iron and zinc) and physio-morphological traits for development of mineral rich rice (*Oryza sativa* L.). **Indian Journal of Biotechnology**, v. 18, p. 69-80, 2019.

KUMAR, S. B.; ARNIPALLI, S. R.; MEHTA, P.; CARRAU, S.; ZIOUZENKOVA, O. Iron Deficiency Anemia: Efficacy and Limitations of Nutritional and Comprehensive Mitigation Strategies. **Nutrients**, v.14, n. 14, p. 2976, 2022.

KUMAR, A.; LAL, S. K.; SAHOO, K.; DASH, G. K.; SAHOO, U.; BEHERA, B.; NAYAK, L.; BAGCHI, T. B. The diversity of phytic acid content and grain processing play decisive role on minerals bioavailability in rice. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 115, p. 105032, 2023.

KUMARI, M.; SHARMA, D.; SANDEEP, S. Biofortification of Vegetable Crops: An Option for Mitigating Hidden Hunger. **International Journal of Economic Plants**, v. 9, n. 3, p. 184-193, 2022.

KUMARI, A.; ROY, A. Enhancing micronutrient absorption through simultaneous fortification and phytic acid degradation. **Food Science and Biotechnology**, p. 1-22, 2023.

KUWANO, M.; OHYAMA, A.; TANAKA, Y.; MIMURA, T.; TAKAIWA, F.; YOSHIDA, K. T. Molecular breeding for transgenic rice with low-phytic acid phenotype through manipulating myo-inositol 3 phosphate synthase gene. **Molecular Breeding**, v. 18, p. 263-272, 2006.

KUWANO, M.; MIMURA, T.; TAKAIWA, F.; YOSHIDA, K.T. Generation of stable 'low phytic acid' transgenic rice through antisense repression of the 1 D - myoinositol 3-phosphate synthase gene using the 18-kDa oleosin promoter. **Plant Biotechnology Journal**, v. 7, n.1, p. 96-105, 2009.

LAENOI, S.; PROM-U-THAI, C.; DELL, B.; RERKASEM, B. Iron and zinc variation along the grain length of different Thai rice varieties. **Science Asia**, v. 41, n. 6, p. 386- 391, 2015.

LAHO, B. M.; NERBÉWENDÉ, S.; HAMED, O. M.; ALPHONSE, S. T.; BOUKARÉ, K.; BILLO, C. S. B. M.; PAULINE, B-K.; MAHAMADOU, S.; Assessment of genetic diversity of local rice accessions cultivated in Guinea revealed by SNPs markers, and identification of markers associated with tolerance to iron toxicity. **African Journal of Biotechnology**, v. 21, n. 6, p.275-286, 2022.

LANGE, C. N.; PEDRON, T.; FREIRE, B. M.; PEREIRA, R. M.; BATISTA, B. L. **Arsenic in Rice Grain**. In: The future of rice demand: Quality beyond productivity. DE OLIVEIRA, A. C.; PEGORARO, C.; VIANA, V. E. Springer International Publishing, p. 71-91, 2020.

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

LARSON, S. R.; RUTGER, J. N.; YOUNG, K. A.; RABOY, V. Isolation and genetic mapping of a non-lethal rice (*Oryza sativa* L.) low phytic acid 1 mutation. **Crop Science**, v. 40, n. 5, p. 1397-1405, 2000.

LARSON, G.; PIPERNO, D. R.; ALLABY, R. G.; PURUGGANAN, M. D.; ANDERSSON, L.; ARROYO-KALIN, M.; BARTON, L.; VIGUEIRA, C. C.; DENHAM, T.; DOBNEY, K.; DOUST, A. N.; GEPTS, P.; GILBERT, M. T. P.; GREMILLION, K. J.; LUCAS, L.; LUKENS, L.; MARSHALL, F. B.; OLSEN, K. M.; PIRES, J. C.; RICHERSON, P. J.; DE CASAS, R. R.; SANJUR, O. I.; THOMAS, M. G.; FULLER, D. Q. Current perspectives and the future of domestication studies. **Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 17, p. 6139-6146, 2014.

LEE, S.; CHIECKO, J.C.; KIM, S. A.; WALKER, E. L.; LEE, Y.; GUERINOT, M. L.; AN, G. Disruption of OsYSL15 leads to iron inefficiency in rice plants. **Plant Physiology**, v. 150, p. 786-800, 2009a.

LEE, S.; JEON, U. S.; LEE, S. J.; KIM, Y.-K.; PERSSON, D. P.; HUSTED, S.; SCHJORRING, J. K.; KAKEI, Y.; MASUDA, H.; NISHIZAWA, N.K.; AN, G. Iron fortification of rice seeds through activation of the nicotianamine synthase gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n, 51, p. 22014–22019, 2009b.

LEE, S.; KIM, Y.-S.; JEON, U.S.; KIM, Y.-K.; SCHJOERRING, J.K.; AN, G. Activation of rice nicotianamine synthase 2 (*OsNAS2*) enhances iron availability for biofortification. **Molecules and Cells**, v. 33, n. 3, p. 269-275, 2012.

LEE, K. J.; FENG, Y. Y.; CHOI, D-H.; LEE, B-W. Lead accumulation and distribution in different rice cultivars. **Journal of Crop Science and Biotechnology**, v. 19, n. 4, p. 323-328, 2016.

LEE, S.-M.; KANG, J.-W.; LEE, J.-Y.; SEO, J.; SHIN, D.; CHO, J.-H.; JO, S.; SONG, Y-C.; PARK, D-S.; KO, J-M.; KOH, H-J.; LEE, J-H. QTL analysis for Fe and Zn concentrations in rice grains using a 682 doubled haploid population derived from a cross between rice (*Oryza sativa*) cultivar 93-683 11 and milyang 352. **Plant Breeding Biotechnology**, v. 8, p. 69-76, 2020.

LEE, C. H. **The Onset of Agriculture and Northeast Asian Neolithic Farm Culture**. In: Korean Food and Foodways. Springer, Singapore, p. 51-70, 2022.

LEVENSON, C. W.; TASSABEHJI, N. M. Iron and ageing: an introduction to iron regulatory mechanisms. **Ageing Research Reviews**, v. 3, p. 251-263, 2004.

LINGAM, S.; MOHRBACHER, J.; BRUMBAROVA, T.; POTUSCHAK, T.; FINKSTRAUBE, C.; BLONDET, E.; GENSCHIK, P.; BAUER, P. Interaction between the bHLH transcription factor FIT and Ethylene Insensitive3/Ethylene Insensitive3-Like1 reveals molecular linkage between the regulation of iron acquisition and ethylene signaling in Arabidopsis. **Plant Cell**, v. 23, n. 5, p. 1815-1829, 2011.

LIANG, G. Iron uptake, signaling, and sensing in plants. **Plant Communications**, v. 3, n. 5, p. 100349, 2022.

LIAO, N.; SETO, E.; ESKENAZI, B.; WANG, M.; LI, Y.; HUA, J. A comprehensive review of arsenic exposure and risk from rice and a risk assessment among a cohort of adolescents in Kunming, China. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 15, n. 2191, p. 1-17, 2018.

LI, C.; ZHOU, A.; SANG, T. Genetic analysis of rice domestication syndrome with the wild annual species, *Oryza nivara*. **New Phytologist**, v. 170, n. 1, p. 185-194, 2006.

LI, T.; LIU, B.; SPALDING, M. H.; WEEKS, D. P.; YANG, B. High-efficiency TALEN-based gene editing produces disease-resistant rice. **Nature Biotechnology**, v. 30, p. 390-392, 2012.

LI, T.; LIU, B.; CHEN, C. Y.; YANG, B. TALEN-mediated homologous recombination produces site-directed DNA base change and herbicideresistant rice. **Journal Genetics and Genomics**, v. 43, p. 297-305, 2016.

LI, C.; LIA, Y.; XU, P.; LING, G.; *OsIRO3* negatively regulates Fe homeostasis by repressing the expression of *OsIRO2*. **Cold Spring Harbor Laboratory bioRxiv – The preprint server for biology**, p. 1-43, 2022.

LI, M.; WATANABE, S.; GAO, F.; DUBOS, C. Iron Nutrition in Plants: Towards a New Paradigm? **Plants**, v. 12, n. 2, p. 1-15, 2023.

LIANG, G. Iron uptake, signaling, and sensing in plants. **Plants Communications**, v. 3, n. 5, p. 100349, 2022.

LIEU, P. T.; HEISKALA, M.; PETERSON, P. A.; YANG, Y. The roles of iron in health and disease. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 2, p. 1–87, 2001.

LIU, Q.; SEGAL, D. J.; GHIARA, J. B.; BARBAS, C. F. Design of polydactyl zinc-finger proteins for unique addressing within complex genomes. **Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 11, p. 5525-5530, 1997.

LIU, D. R.; HUANG, W. X.; CAI, X. L. Oligomerization of rice granule-bound starch synthase 1 modulates its activity regulation. **Plant Science**, v. 210, p. 141-150, 2013.

LIU, S.; ZHONG, H.; MENG, X.; SUN, T.; LI, Y.; PINSON, S. R. M.; CHANG, S. K. C.; PENG, Z. Genome-wide association studies of ionomic and agronomic traits in USDA mini core collection of rice and comparative analyses of different mapping methods. **BMC Plant Biology**, v. 20, n. 1, p. 441, 2021.

LIU, G.; LIN, Q.; JIN, S.; GAO, C. The CRISPR-Cas toolbox and gene editing technologies. **Molecular Cell**, v. 82, p. 333-347, 2021, 2022.

LONDONIO, A.; MORZÁN, E.; SMICHOWSKI, P. Determination of toxic and potentially toxic elements in rice and rice-based products by inductively coupled plasma mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 284, p. 149-154, 2019.

LOPES, G.; ÁVILA, F. W.; GUILHERME, L. R. G. Selenium behavior in the soil environment and its implication for human health. **Ciencia e Agrotecnologia**, v. 41, n. 6, p. 605-615, 2017.

LOUREIRO, M. P.; DA CUNHA, L. R.; NASTARO, B. T.; PEREIRA, K. Y. S.; NEPOMOCENO, M. L. Biofortificação de alimentos: problema ou solução? **Segurança Alimentar Nutricional**, v. 25, n. 2, p. 66-84, 2018.

LU, K.; LI, L.; ZHENG, X.; ZHANG, Z.; MOU, T.; HU, Z. Quantitative trait loci controlling Cu, Ca, Zn, Mn and Fe content in rice grains. **Journal of Genetics**, v. 87, n. 3, p. 305-310, 2008.

LU, F.; AMMIRAJU, J. S.; SANYAL, A.; ZHANG, S.; SONG, R.; CHEN, J.; LI, G.; SUI, Y.; SONG, X.; CHENG, Z.; DE OLIVEIRA, A. C.; BENNETZEN, J. L.; JACKSON, S. A.; WING, R. A.; CHENA, M. Comparative sequence analysis of *MONOCULM1* -orthologous regions in 14 *Oryza* genomes. **Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 6, p. 2071-2076, 2009.

LUCCA, P.; HURRELL, R.; POTRYKUS, I. Genetic engineering approaches to improve the bioavailability and the level of iron in rice grains. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 102, p. 392-397, 2001.

LUCCA, P.; HURRELL, R.; POTRYKUS, I. Fighting iron deficiency anemia with iron-rich rice. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 21, n. 3, p. 184S-190S, 2002.

LUDWIG, Y.; SLAMET-LOEDIN, I. H. Genetic biofortification to enrich rice and wheat grain iron: From genes to product. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, p. 1-10, 2019.

MA, D.; LIU, F. Genome editing and its applications in model organisms. **Genomics, Proteomics and Bioinformatics**, v. 13, n. 6, p. 336-344, 2015.

MA, X.; ZHANG, Q.; ZHU, Q.; LIU, W.; CHEN, Y.; QIU, R.; WANG, B.; YANG, Z.; LI, H.; LIN, Y.; XIE, Y.; SHEN, R.; CHEN, S.; WANG, Z.; CHEN, Y.; GUO, J.; CHEN, L.; ZHAO, X.; DONG, Z.; LIU, Y-G. A robust CRISPR/Cas9 system for

convenient, high-efficiency multiplex genome editing in monocot and dicot plants. **Molecular plant**, v. 8, p. 1274-84, 2015.

MA, D.; LIU, F. Genome editing and its applications in model organisms. **Genomics Proteomics and Bioinformatics Research**, v. 13, p. 336-344, 2015.

MACKILL, D. J.; COFFMAN, W. R.; GARRITY, D. P. **Rainfed lowland rice improvement**. Los Baños, Laguna. 242 p. 1996.

MAGALHÃES JÚNIOR, A. M.; COSTA DE OLIVEIRA, A. Arroz: Alimentando a humanidade há milênios. In: BARBIERI, R. L.; STUMPF, E. R. T. **Origem e evolução de plantas cultivadas**. 1a ed., Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, p. 185-208, 2008.

MAGALHÃES JR, A. M. de.; FAGUNDES, P. R. R.; FRANCO, D. F.; SEVERO, A. C. M. **A avaliação de Linhagens de Arroz Irrigado quanto à Toxidez por Ferro**. Arroz Irrigado: Resultados de pesquisa do melhoramento genético para tolerância à estresses abióticos, na Embrapa Clima Temperado, 2007/2008. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, p.37-44, 2009.

MAGANTI, S.; SWAMINATHAN, R.; PARIDA, A. Variation in Iron and Zinc Content in Traditional Rice Genotypes. **Agricultural Research**, v. 9, n. 3, p. 316-328, 2020.

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

MAJUMDER, S.; DATTA, K.; DATTA, S. K. Rice biofortification: High iron, zinc, and Vitamin-A to fight against “hidden hunger”. **Agronomy**, v. 9, n. 12, p. 1-22, 2019.

MAKAROVA, K. S.; HAFT, D. H.; BARRANGOU, R.; BROUNS, S. J. J.; CHARPENTIER, E.; HORVATH, P.; MOINEAU, S.; MOJICA, F. J. M.; WOLF, Y. I.; YAKUNIN, A. F.; OOST, J. V. D.; KOONIN, E. V. Evolution and classification of the CRISPR–Cas systems. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, p. 467-477, 2011.

MALHOTRA, V. K. **Biochemistry for Students**. In: Jaypee Brothers Medical Publishers P. Ltd, 10 ed. New Delhi: India, 1998.

MANSOUR, D.; HOFMANN, A.; GEMZELL-DANIELSSON, K. A Review of Clinical Guidelines on the Management of Iron Deficiency and Iron-Deficiency Anemia in Women with Heavy Menstrual Bleeding. **Advances in Therapy**, v. 38, p. 201-225, 2021.

MARTINS, A. C.; KRUM, B. N.; QUEIRÓS, L.; TINKOY, A. A.; SKALNY, A. V.; BOWMAN, A. B.; ASCHNER, M. Manganese in the Diet: Bioaccessibility, Adequate Intake, and Neurotoxicological Effects. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 68, n. 46, p. 12893-12903, 2020.

MASUDA, H.; SUZUKI, M.; MORIKAWA, K. C.; KOBAYASHI, T.; NAKANISHI, H.; TAKAHASHI, M.; SAIGUSA, M.; MORI, S.; NISHIZAWA, N. K. Increase in iron and zinc concentrations in rice grains via the introduction of barley genes involved in phytosiderophore synthesis. **Rice**, v. 1, p.100-108, 2008.

MASUDA, H.; USUDA, K.; KOBAYASHI, T.; ISHIMARU, Y.; KAKEI, Y.; TAKAHASHI, M.; HIGUCHI, K.; NAKANISHI, H.; MORI, S.; NISHIZAWA, N.K. Overexpression of the barley nicotianaminesynthase gene HvNAS1 increases iron and zinc concentrations in rice grains. **Rice**, v. 2, p. 155–166, 2009.

MASUDA, H.; ISHIMARU, Y.; AUNG, M. S.; KOBAYASHI, T.; KAKEI, Y.; TAKAHASHI, M.; HIGUCHI, K.; NAKANISHI, H.; NISHIZAWA, N. K. Iron biofortification in rice by the introduction of multiple genes involved in iron nutrition. **Scientific reports**, v. 2, p. 1- 7, 2012.

MASUDA, H.; AUNG, M. S.; NISHIZAWA, N. K. Iron biofortification of rice using different transgenic approaches. **Rice**, v. 6, n. 40, p. 1-12, 2013a.

MASUDA, H.; KOBAYASHI, T.; ISHIMARU, Y.; TAKAHASHI, M. AUNG, M. S.; NAKANISHI, H.; MORI, S.; NISHIZAWA, N. K. Iron biofortification in rice by the introduction of three barley genes participated in mugineic acid biosynthesis with soybean ferritin gene. **Frontiers in Plant Science**, v.4, n. 132, p. 1-12, 2013b.

MASUDA, H.; AUNG, M. S.; KOBAYASHI, T.; Naoko K. NISHIZAWA, N. T. **Iron Biofortification: The Gateway to Overcoming Hidden Hunger**. In: Springer Nature Switzerland AG 2020, A. Costa de Oliveira et al. (eds.), *The Future of Rice Demand: Quality Beyond Productivity*, 2020.

MATRES, J. M.; ARCILLAS, E.; CUETO-REAÑO, M. F.; SALLAN-GONZALES, R.; TRIJATMIKO, K. R.; SLAMET-LOEDIN, I.; **Biofortification of Rice Grains for Increased Iron Content**. In: Ali, J., Wani, S.H. (eds) *Rice Improvement*. Springer, Cham., p. 471-486, 2021.

MATSUO, T.; FUTSUHARA, Y.; KIKUCHI, F.; YAMAGUCHI, H. 1997. **Science of the rice plant**. In: Food and Agriculture Policy Research Center. Tokyo: Japan, 1997, 1008 p.

MARRAFFINI, L. A. CRISPR-Cas immunity in prokaryotes. **Nature**, v. 526, n. 7571, p.55-61, 2015.

MARQUES, A. C.; LIDON, F. C.; COELHO, A. R. F.; PESSOA, C. C.; LUÍS, I. C.; CAMPOS, P. S.; SIMÕES, M.; ALMEIDA, A. S.; PESSOA, M. F.; GALHANO, C.; GUERRA, M.; LEITÃO, R. G.; LEGOINHA, P.; RAMALHO, J. C.; SEMEDO, J. N.; RODRIGUES, A. P.; MARQUES, P.; SILVA, C.; RIBEIRO-BARROS, A.; SILVA, M. J.; SILVA, M. M.; OLIVEIRA, K.; FERREIRA, D.; PAIS, I. P.; REBOREDO, F. H. Effect of Rice Grain (*Oryza sativa* L.) Enrichment with Selenium on Foliar Leaf Gas Exchanges and Accumulation of Nutrients. **Plants**, v. 10, n. 288, p. 1-18, 2021.

MAYER, J. E.; PFEIFFER, W. H.; BEYER, P. Biofortified crops to alleviate micronutrient malnutrition. **Current Opinion Plant Biology**, v. 11, n. 2, p.166–170, 2008.

MEHARG, A. A.; RAHMAN, M. Arsenic contamination of Bangladesh paddy field soils: implications for rice contribution to arsenic consumption. **Environmental Science and Technology**, v. 37, p. 229-234, 2003.

MENQUER, P. K.; SPEROTTO, R. A.; RICACHENEVSKY, F. K. A walk on the wild side: *Oryza* species as source for rice abiotic stress tolerance. **Genetics and Molecular Biology**, v. 40, n. 1, p. 238-252, 2017.

MEENA, R. K.; KOLI, D. K.; KOLI, G. K.; MEENA, R. K.; KIRAN. Transgenic Approach for Biofortification. **Biotica Research**, v. 4, n. 5, p. 388-391, 2022.

MEYER, R. S.; DUVAL, A. E.; JENSEN, H. R. Patterns and processes in crop domestication: an historical review and quantitative analysis of 203 global food crops. **New Phytologist**, v. 196, p. 29-48, 2012.

MCCAY, C. M. **Notes on the History of Nutrition Research**. Bern: Huber, 1973.

MCCOLLUM, E. V. **A History of Nutrition**. Boston: Houghton Mifflin, 1957.

MCDOWELL, L. R. **Minerals in Animal And Human Nutrition**, 2nd ed. Amsterdam: Elsevier Science, p. 660, 2003.

MILLA, R.; BASTIDAS, J. M.; TURCOTTE, M. M.; JONES, G.; VIOLLE, C.; OSBORNE, C. P.; CHACON-LABELLA, J.; SOSINSKY, E. E.; KATTGE, J.; LAUGHLIN, D. C.; FOREY, E.; MINDEN, V.; CORNELISSEN, J. H. C.; AMIAUD, B.; KRAMER, K.; BOENISCH, G.; HE, T.; PILLAR, V. D.; BYUN, C. Phylogenetic patterns and phenotypic profiles of the species of the plants and mammals farmed for food. **Nature Ecology and Evolution**, v. 2, p. 1808-1817, 2018.

Ministério da Saúde. **Como prevenir a anemia e outras deficiências de nutrientes na infância**. Boletim Enfac, 2014. Disponível em: [http://189.28.128.100/dab/docs/portaldab/documentos/boletim\\_enfac2014](http://189.28.128.100/dab/docs/portaldab/documentos/boletim_enfac2014). Acesso em 01 de maio de 2020.

MITSUDA, N.; OHME-TAKAGI, M.; Functional Analysis of Transcription Factors in Arabidopsis. **Plant and Cell Physiology**, v.50, n.7, p. 1232–1248, 2009.

MISHRA, R.; JOSHI, R. K.; ZHAO, K. Base editing in crops: current advances, limitations and future implications. **Plant Biotechnology Journal**, v. 18, n. 1, p. 20-31, 2020.

MOJENA, R. Hierarchical grouping methods and stopping rules: an evaluation. **The Computer Journal**, v. 20, n. 4, p. 1-5, 1977.

MONACO, F.; SALI, G. How water amounts and management options drive Irrigation Water Productivity of rice. A multivariate analysis based on field experiment data. **Agricultural Water Management**, v. 195, p. 47-57, 2018.

MONTEIRO, L. R.; LANGE, C. N.; FREIRE, B. M.; PEDRON, T.; DA SILVA, J. J. C.; DE MAGALHÃES JÚNIOR, A. M.; PEGORARO, C.; BUSANELLO, C.; BATISTA, B. L. Inter- and intra-variability in the mineral content of rice varieties grown in various microclimatic regions of southern Brazil. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 92, p. 103535, 2020.

MONROY-GOMEZ, J.; FERRABOSCHI, C.; VAN ZUTPHEN, K. G.; GAVIN-SMITH, B.; AMANQUAH, D.; KRAEMER, K. Small and Medium Enterprises' Perspectives on Food Fortification Amid the Growing Burden of Malnutrition. **Nutrients**, v. 14, n. 18, p. 3837, 2022.

MOREL, F. M. M.; HERING, J. G. **Principles and Applications of Aquatic Chemistry**. New York: John Wiley and Sons, p. 608, 1993.

MORI, S. Iron acquisition by plants. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 2, p. 250– 253, 1999.

MORRISSEY, J.; LOU, G. M. Iron uptake and transport in plants: The good, the bad, and the ionome. **Chemical Reviews**, v. 109, n. 10, p. 4553-4567, 2009.

NAGESH, P.; USHARANI, G.; NEERAJA, C. N.; BABU, V. R.; REDDY, T. D. Molecular mapping of high iron and zinc rich regions in rice (*Oryza sativa* L.) grains using microsatellite markers. **Helix**, v. 2, p. 231-237, 2013.

NAITO, S.; MATSUMOTO, E.; SHINDOH, K.; NISHIMURA, T. Effects of polishing, cooking, and storing on total arsenic and arsenic species

concentrations in rice cultivated in Japan. **Food Chemistry**, v. 168, p. 294-301, 2015.

NAJAFIAN, G.; KAFFASHI, A. K.; JAFAR-NEZHAD, A. Analysis of Grain Yield Stability in Hexaploid Wheat Genotypes Grown in Temperate Regions of Iran Using Additive Main Effects and Multiplicative Interaction. **Journal of Agricultural Science Technology**, v. 12, p. 213-222, 2010.

NAKANISHI, H.; YAMAGUCHI, H.; SASAKUMA, T.; NISHIZAWA, N. K.; MORI, S. Two dioxygenase genes, *Ids3* and *Ids2*, from *Hordeum vulgare* are involved in the biosynthesis of mugineic acid family phytosiderophores. **Plant Molecular Biology**, v. 44, p. 199-207, 2000.

NANDHINI, GIDEON, A.; NITHANJYAL, S. Conceptual review on the conventional and genome-wide association analysis towards developing salinity tolerance in rice. **Plant Gene**, v. 28, n. 100327, p. 1-10, 2021.

NAYAR, N. M. **Origin and Phylogeny of Rices**. First published. In: Elsevier 3031 Waltham, USA, 2014.

NAWAZ, Z.; KAKAR, K. U.; LI, X.; LI, S.; ZHANG, B.; SHOU, H.; SHU, Q. Genome-wide association mapping of Quantitative Trait Loci (QTLs) for contents of eight elements in Brown Rice (*Oryza sativa* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 36, p. 8008-8016, 2015.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. **Database resource taxonomy rice information**. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/> - acessado em 18 de março de 2021.

NEMUDRYI, A. A.; VALETINOVA, K. R.; MEDVEDEV, S. P.; ZAKIAN, S. M. TALEN and CRISPR/Cas genome editing systems: tools of discovery. **Acta Naturae**, v. 6, n. 3, p. 19-40, 2014.

NEMETH, E.; GANZ, T. Heparin-Ferroportin Interaction Controls Systemic Iron Homeostasis. **International Journal of Molecular Science**, v. 22, n. 12, p. 6493, 2021.

NGUYEN, A. D.; MCMAHAN, Z. H.; VOLKMANN, E. R. Micronutrient Deficiencies in Systemic Sclerosis: A Scoping Review. **Rheumatology**, v. 17, n. 14, p. 309-327, 2022.

NISSIM, L. et al. Multiplexed and Programmable Regulation of Gene Networks with an Integrated RNA and CRISPR/Cas Toolkit in Human Cells. **Molecular**

**Cell**, v. 54, n. 4, p. 698-710, 2014.

NORTON, G. J.; DEACON, C. M.; XIONG, L.; HUANG, S.; MEHARG, A. A.; PRICE, A. H. Genetic mapping of the rice ionome in leaves and grain: Identification of QTLs for 17 elements including arsenic, cadmium, iron and selenium. **Plant Soil**, v. 329, p. 139-153, 2010.

NORTON, G. J.; WILLIAMS, P. N.; ADOMAKO, E. E. PRICE, A. H.; ZHU, Y.; ZHAO, F-J.; MCGRATH, S.; DEACON, C. M.; VILLADA, A.; SOMMELLA, A.; LU, Y.; MING, L.; DE SILVA, M. C. S.; BRAMMER, H.; DASGUPTA, T.; ISLAM, M. R.; MEHARG, A. A. Lead in rice: Analysis of baseline lead levels in market and field collected rice grains. **Science of The Total Environment**, v. 485-486, p. 428-434, 2014.

NOZOYE, T.; NAGASAKA, S.; KOBAYASHI, T.; TAKAHASHI, M.; SATO, Y.; SATO, Y.; UOZUMI, N.; NAKANISHI, H.; NISHIZAWA, N. K. Phytosiderophore Efflux Transporters Are Crucial for Iron Acquisition in Gramineous Plants. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, p. 5446-5454, 2011.

NOZOYE, T.; WIREN, N.; SATO, Y.; HIGASHIYAMA, T.; NAKANISHI H.; NISHIZAWA N. K. Characterization of the Nicotianamine Exporter ENA1 in Rice. **Frontiers Plant Science**, v. 10, n. 502, p. 1-17, 2019.

NIZOLLI, V. O.; PEGORARO, C.; OLIVEIRA, A. C. Rice blast: strategies and challenges for improving genetic resistance. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.S, p. e387721S9, 2021.

NIZOLLI, V. O.; DE OLIVEIRA, V. F.; MAIA, L. C.; PEGORARO. C.; DE OLIVEIRA, A. C. Gene editing techniques in rice. **CABI Reviews**, 2023.

OHANENYE, C.; EMENIKE, C. U.; MENSI, A.; MEDINA-GODOY, S.; JIN, J.; AHMED, T.; SUN, X.; UDENIGWE, C. C. Food fortification technologies: Influence on iron, zinc and vitamin A bioavailability and potential implications on micronutrient deficiency in sub-Saharan Africa. **Scientific African**, v. 11, p. e00667, 2021.

OGO, Y.; ITAI, R. N.; NAJANISHI, H.; INOUE, H.; KOBAYASHI, T.; SUZUKI, M.; TAKAHASHI, M.; MORI, S.; NISHIZAWA, N. K. Isolation and characterization of IRO2, a novel iron-regulated bHLH transcription factor in gramineous plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 57, n. 11, p. 2867-2878, 2006.

OGO, Y.; ITAI, R. N.; NAKANISHI, H.; KOBAYASHI, T.; TAKAHASHI, M.; MORI, S.; NISHIZAWA, N. K. **The Plant Journal: for cell and molecular**

**biology**, v. 51, n. 3, p. 366-377, 2007.

OGO, Y.; KOBAYASHI, T.; REIKO, N. I.; NAKANISHI, H.; KAKEI, Y.; TAKAHASHI, M.; TOKI, S.; MORI, S.; NISHIZAWA, N. K. A novel NAC transcription factor, IDEF2, that recognizes the iron deficiency-responsive element 2 regulates the genes involved in iron homeostasis in plants. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 19, p. 13407-13417, 2008.

OGO, Y.; ITAI, R. N.; KOBAYASHI, T.; AUNG, M. S.; NAKANISHI, H.; NISHIZAWA, N. K. OsIRO2 is responsible for iron utilization in rice and improves growth and yield in calcareous soil. **Plant Molecular Biology**, v. 75, n. 6, 593–605, 2011.

OKA, H. I.; MORISHIMA, H. Wild and cultivated rice. In: MATSUO, T. et al. (Ed) **Science of the Rice Plant: Genetics**. Tokyo: Food and Agriculture Policy Research Center, v. 3, p. 88-111, 1997.

OLIVA, N.; CHADHA-MOHANTY, P.; POLETTI, S.; ABRIGO, E.; ATIENZA, G.; TORRIZO, L.; GARCIA, R.; DUENAS, C., Jr.; PONCIO, M.A.; BALINDONG, J.; MANZANILLA, M.; MONTECILLO, F.; ZAIDEM, M.; BARRY, G.; HERVÉ, P.; SHOU, H.; SLAMET-LOEDIN, I. H. Large-scale production and evaluation of marker-free indica rice IR64 expressing phytoferritin genes. **Molecular Breeding: new strategies in plant improvement**, v. 33, n. 1, p. 23-37, 2014.

PANDELOVA, M.; LOPEZ, W. L.; MICHALKE, B.; SCHRAMM, K.-W. Ca, Cd, Cu, Fe, Hg, Mn, Ni, Pb, Se, and Zn contents in baby foods from the EU market: Comparison of assessed infant intakes with the present safety limits for minerals and trace elements. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 27, p. 120-127, 2012.

PANDIT, E.; PAWAR, S.; SANGHAMITRA, P.; PRADHAN, S. K. Molecular Breeding for Iron Bio-Fortification in Rice Grain: Recent Progress and Future Perspectives. **Molecular Breeding for Rice Abiotic Stress Tolerance and Nutritional Quality**, p. 315-340, 2021.

PANG, H.; WU, Y.; LIU, Z.; XIE, Y.; CHEN, Q.; LI, Y.; WU, L.; WANG, Z.; AHMED, Z.; ZHENG, X. Genome-wide differences of alternative splicing between *Oryza sativa* ssp. *indica* and *Oryza sativa* ssp. *japonica*. **Acta Physiology Plant**, v. 45, n. 37, p. 1-11, 2023.

PANIZ, F. P.; PEDRON, T.; FREIRE, B. M.; TORRES, D. P.; SILVA, F. F.; BATISTA, B. L. Effective procedures for the determination of As, Cd, Cu, Fe, Hg, Mg, Mn, Ni, Pb, Se, Th, Zn, U and rare earth elements in plants and foodstuffs. **Analytical Methods**, v. 10, n. 33, p. 4094-4103, 2018.

PAUL, S.; ALI, N.; GAYEN, D.; DATTA, S.K.; DATTA, K. Molecular breeding of Osfer2 gene to increase iron nutrition in rice grain. **GM Crops and Food**, v. 3, n. 4, p. 310–316, 2012.

PASAMONTES, L.; HAIKER, M.; WYSS, M.; TESSIER, M.; VAN-LOON, A. P. G. M. Gene cloning, purification, and characterization of a heat-stable phytase from the fungus *Aspergillus fumigatus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 5, p. 1696-1700, 1997.

PAWAR, S.; PANDIT, E.; MOHANTY, C.; SAHA, D.; PRADHAN, S. K. Population genetic structure and association mapping for iron toxicity tolerance in rice S. **Plos One**, v. 16, n. 3, p. e0246232, 2021.

PENG, S.; CASSMAN, K. G.; VIRMANI, S. S.; SHEEHY, J.; KHUSH, G. S. Yield potential trends of tropical tice since the release of IR8 and the challenge of increasing rice yield potential. **Crop Science**, v. 39, n. 1, p. 1552-1559, 1999.

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

PEREIRA, R. M.; CRIZEL, M. G.; NOVO, D. L. R.; DOS SANTOS, C. M. M.; MESKO, M. F. Multitechnique determination of metals and non-metals in sports supplements after microwave-assisted digestion using diluted acid. **Microchemical Journal**, v. 145, p. 235-241, 2019.

PEREIRA, R. M.; LANGE, C. N.; PEDRON, T.; PANIZ, F. P.; OLIVEIRA, G. S. P.; MASUDA, H. P.; BATISTA, B. L. **Lead in Rice Grain**. In: Costa de Oliveira, A., Pegoraro, C., Ebeling Viana, V. (eds) *The Future of Rice Demand: Quality Beyond Productivity*. Springer International Publishing, Chem. Switzerland, p. 93-131, 2020.

PETRY, N.; BOY, E.; WIRTH, J. P.; HURRELL, R. F. Review: The potential of the common bean (*Phaseolus vulgaris*) as a vehicle for iron biofortification. **Nutrients**, v. 7, n. 2, p.1144-1173, 2015.

PINSON, S. R. M.; TARPLEY, L.; YAN, W.; YEATER, K.; LAHNER, B.; YAKUBOVA, E.; HUANG, X-Y.; ZHANG, M.; GUERINOT, M. L.; SALT, D. E. Worldwide Genetic Diversity for Mineral Element Concentrations in Rice Grain. **Crop Science**, v. 55, p. 294-311, 2015.

POLETTI, J.; POZEBON, D.; DE FRAGA, M. V. B.; DRESSLER, V. L.; DE MORAES, D. P. Toxic and micronutrient elements in organic, brown and polished rice in Brazil. **Food Additives & Contaminants: Part B**, v. 7, n. 1, p. 63-69, 2014.

PRADHAN, S. K. et al. Linkage disequilibrium mapping for grain Fe and Zn enhancing QTLs useful for nutrient dense rice breeding. **BMC Plant Biology**, v. 20, n. 57, p. 1-24, 2020.

PRADHAN, S. K.; PANDIT, E.; PAWAR, S.; NAVEENKUMAR, R.; BARIK, S. R.; MOHANTY, S. P.; NAYAK, D. K.; GHRITLAHRE, S. K.; RAO, D. S.; REDDY, J. N.; PATNAIK, S. S. C. Linkage disequilibrium mapping for grain Fe and Zn enhancing QTLs useful for nutrient dense rice breeding. **BMC Plant Biology**, v. 20, n. 1, p. 57, 2020.

PRASAD, R.; SHIVAY, Y. S.; KUMAR, D. Agronomic biofortification of cereal grains with iron and zinc. **Advances in Agronomy**, v.125, n.1, p. 55-91, 2014.

PRASHANTH, L.; KATTAPAGARI, K. K.; CHITTURI, R. T.; BADDAM, V. R. R.; PRASAD, L. K. A review on role of essential trace elements in health and disease. **Journal of Dr, NTR University of Health Sciences**, v. 4, n. 2, p. 1-11, 2015.

PRYSIAZHNIUK, L.; HONCHAROV, Y.; CHERNII, S.; HRYNIV, S.; MELNYK, S. The use of DNA markers for the evaluation of maize lines and hybrids based on cytoplasmic male sterility. **Agronomy Research**, v. 18, n. 2, 1424–1432, 2020.

PURUGGANAN, M. D.; CHOI, J. Y. Multiple origin but single domestication led to *Oryza sativa*. **GENES, GENOMICS, GENETICS**, v. 8, n. 3, p. 797-803, 2018.  
PURUGGANAN, M. Evolutionary Insights into the Nature of Plant Domestication. **Current Biology**, v. 29, n. 14, p. R705-R714, 2019.

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

QUAN, C.; BAI, Z.; ZHENG, S.; ZHOU, J.; YU, Q.; XU, Z.; GAO, X.; LI, L.; ZHU, J.; JIA, X.; CHEN, R. Genome-wide analysis and environmental response profiling of phosphate-induced-1 family genes in rice (*Oryza sativa*). **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 33, n. 1, p. 627-638, 2019.

QUINTAES, K. D.; BARBERÁ, R.; CILLA, A. Iron bioavailability in iron-fortified cereal foods: The contribution of in vitro studies. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 57, n. 10, p. 2028-2041, 2017.

QUINTERO-GUTIÉRREZ, A. G.; GONZÁLEZ-ROSENDO, G.; SÁNCHEZ-MUÑOZ, J.; POLO-POZO, J.; RODRÍGUEZ-JEREZ, J. J. Bioavailability of heme iron in biscuit filling using piglets as an animal model for humans. **Journal of Biological Science**, v. 4, p. 58-62, 2008.

RAHIM, M.; KHAN, K. S.; IJAZ, S. S.; AKRAM, Z. Zinc and Iron Enrichment in Wheat Grain Through Soil Amendments. **Pakistan journal of scientific industrial research Series B: biological science**, v.65B, n. 2, p.157-166, 2022.

RAI, S.; SINGH, P; K.; MANKOTIA, S.; SWAIN, J.; SATBHAI, S. B. Iron homeostasis in plants and its crosstalk with copper, zinc, and manganese. **Plant Stress**, v. 1, n. 100008, p. 1-9, 2021.

RAJ, A.; STEPHENS, M.; PRITCHARD, J. K. FastSTRUCTURE: Variational inference of population structure in large SNP data sets. **Genetics**, v. 197, n. 2, p. 573-589, 2014.

RAMSEY, A. J.; HILLAS, P.J.; FITZPATRICK, P. F.; Characterization of the active site iron in tyrosine hydroxylase. Redox states of the iron. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, p. 24395-243400, 1996.

RASHEED, A.; FAHAD, S.; HASSAN, M. U.; TAHIR, M. M.; AAMER, M.; WU, Z. M. A review on aluminum toxicity and quantitative trait loci mapping in rice (*Oryza sativa* L). **Applied Ecology and Environmental Research**, v. 18, n. 3, p. 3951-3961, 2020.

RAWAT, N.; NEELAM, K.; TIWARI, V. K.; DHALIWAL, H. S. Biofortification of cereals to overcome hidden hunger, *Plant Breeding*. **Plant Breeding**, v. 132, p. 437-445, 2013.

REDDY, C. K.; KIMI, L.; HARIPRIYA, S.; KANG, N. Effects of Polishing on Proximate Composition, Physico- Chemical Characteristics, Mineral Composition and Antioxidant Properties of Pigmented Rice. **Rice Science**, v. 24, n. 5, p. 241-252, 2017.

REIS, A. R.; MORAES, M.; RAMOS, S. J.; GUILHERME, L. R. G. Agronomic biofortification of upland rice with selenium to improve human health. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 27S1, p. 42-42, 2013.

REZAEI, M.; GHASEMIDEHKORDI, B.; PEYKARESTAN, B.; SHARIATIFAR, N.; JAFARI, M.; FAKHRI, Y.; JABBARI, M.; KHANEGHAH, A. M. Toxic elements concentration in fruits collected in markazi province (Iran): A probabilistic health risk assessment. **Biomedical and Environmental Sciences**, v. 32, p. 1-15, 2019.

REYON, D.; MAEDER, M. L.; KHAYTER, C.; TSAI, S. Q.; FOLEY, J. E.; SANDER, J. D.; et al. Engineering customized TALE nucleases (TALENS) and TALE transcription factors by fast ligation-based automatable solid-phase highthroughput (FLASH) assembly. **Current Protocols in Molecular Biology**, v. 12, n. 12.16, p. 1-22, 2013.

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

RÖMHELD, V.; MARSCHNER, H. Evidence for a specific uptake system for iron phytosiderophores in roots of grasses. **Plant Physiology**, v. 80, p. 175–180, 1986.

ROY, S. C.; 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.

ROY, S.; MARNDI, B. C.; MAWKHLIENG, B.; BANERJEE, A.; YADAV, R. M.; MISRA, A. K.; BANSAL, K. C. 2016. Genetic diversity and structure in hill rice (*Oryza sativa* L.) landraces from the North Eastern Himalayas of India. **BMC genetics**, v. 17, p. 1–15, 2016.

SAHRAWAT, K.L. **Managing iron toxicity in lowland rice: the role of tolerant genotypes and plant nutrients**. In: Rice is life: scientific perspectives for the 21st century: Proceedings of the World Rice Research Conference. Tsukuba: Japan, v. 1, p. 452-454, 2004.

SANG, T.; GE, S. Understanding rice domestication and implications for cultivar improvement. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 16, n. 2, p. 139-146, 2013.

SANG, T.; GE, S. The puzzle of rice domestication. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 49, n. 6, p.760-768, 2007.

SANTOS, R. S.; JÚNIOR, A. T. A.; PEGORARO, C.; OLIVEIRA, A. C. Dealing with iron metabolism in rice: from breeding for stress tolerance to biofortification. **Genetics and Molecular Biology**, v. 40, n. 1, p. 312-325, 2017.

SARLA, N.; SWAMY, B. P. M. *Oryza glaberrima*: A source for the improvement of *Oryza sativa*. **Current Science**, v. 89, n. 6, p. 955-963, 2005.

SATARUG, S. Dietary cadmium intake and its effects on kidneys, **Toxics**, v. 6, n. 15, p. 1-23, 2018.

SCHAAF, G.; LUDEWIG, U.; ERENOGLU, B. E.; MORI, S.; KITAHARA, T.; VON WIRÉN, N. ZmYS1 functions as a proton-coupled symporter for phytosiderophore- and nicotianamine-chelated metals. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p. 9091–9096, 2004.

SCHMIDT, F.; FORTES, M.A.; WESZ, J.; BUSS, G.L.; SOUZA, R. O. Impacto do manejo da água na toxidez por ferro no arroz irrigado por alagamento. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 37, n. 5, 2013.

SCHROEDER, J. I.; DELHAIZE, E.; FROMMER, W. B.; GUERINOT, M. L.; HARRISON, M. J.; HERRERA-ESTRELLA, L.; HORIE, T.; KOCHIAN, L. V.; MUNNS, R.; NISHIZAWA, N.K.; TASY, Y-F.; SANDERS, D. Using membrane transporters to improve crops for sustainable food production. **Nature**, v. 497, n. 7447, p. 60–66, 2013.

SENGUPTA, S.; MAJUMDER, A. L. *Porteresia coarctata* (Roxb.) Tateoka, a wild rice: A potential model for studying salt-stress biology in rice. **Plant Cell and Environment**, v. 33, p. 526-542, 2010.

SHAHANE, A. A.; SHIVAY, Y. S. Agronomic Biofortification of Crops: Current Research Status and Future Needs. **Indian Journal of Fertilisers**, v. 18, n. 2, p. 164-179, 2022.

SHAHID, M.; NAYAK, A.K.; SHUKLA, A. K.; TRIPATHI, R.; KUMAR, A.; RAJA, R.; PANDA, B. B.; MEHER, J.; BHATTACHARYYA, P.; DASH, D. Mitigation of iron toxicity and Iron, Zinc, and Manganese nutrition of Wetland Rice Cultivars (*Oryza sativa* L.) grown in iron-toxic soil. **CLEAN - Soil Air Water**, v. 42, n.11, p. 1604-1609, 2014.

SHANINA, E. P.; LIKHODEYEVSKY, G. A. Evaluation of interspecific potato breeding material with a complex of genes of immunity to potato virus y using molecular markers. **Agronomy Research**, v. 19, n. 1, p. 224-231, 2021.

SHARMA, P.; DUBEY, R. S. Lead toxicity in plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 17, n. 1, p. 35-52, 2005.

SHARMA, V.; SAINI, D. K.; KUMAR, A.; KAUSHIK, P. A Review of Important QTLs for Biofortification Traits in Rice. Preprints, p. 1–16, 2020.

SHERGILL-BONNER, R. Micronutrients. **Journal of Pediatrics Child Health**, v. 27, n. 8, p. 357–62, 2017.

SHUKLA, V.; GUPTA, M.; URNOV, F.; GUSCHIN, D.; JAN, M.; BUNDOCK, P. **Targeted modification of malate dehydrogenase**. WO Patent Publication Number: WO 2013166315 A1, 2013.

SINGH, M. UPADHYAYA, H. **Genetic and Genomic Resources for Grain Cereals Improvement**. Academic Press, p. 384, 2016.

SINGH, S. P.; GRUISSEM, W.; BHULLAR, N. K. Single genetic locus improvement of iron, zinc and  $\beta$ -carotene content in rice grains. **Scientific Reports**, v. 7, n. 6883, p. 1-11, 2017a.

SINGH, S. P.; KELLER, B.; GRUISSEM, W.; BHULLAR, N. K. Rice nicotianamine synthase 2 expression improves dietary iron and zinc levels in wheat. **Theoretical and Applied Genetics**, v.130, n. 2, p. 283-292, 2017b.

SINGH, G.; GUPTA, M. K.; CHAURASIYA, S.; SHARMA, V. S.; PIMENOV, D. Y. Rice straw burning: a review on its global prevalence and the sustainable alternatives for its effective mitigation. **Environmental Science Pollution Restoration**, v. 28, p. 32125–32155, 2021.

SINGH, S. K.; BARMAN, M.; SIL, A.; PRASAD, J. P.; KUNDU, S.; BAHUGUNA, R. N. Nutrient biofortification in wheat: opportunities and challenges. **Cereal Research Communications**, 2022.

SINGH, N.; BHATLA, S. C. Heme oxygenase-nitric oxide crosstalk-mediated iron homeostasis in plants under oxidative stress. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 182, p. 192-205, 2022.

ŞKİPARS, V.; RUŇIŞ, D.; LOČMELE, I.; SEILE, S.; MEŽAKA, I.; LEGZDIŅA, L. Evaluation of Morphological Traits, Genetic Diversity and Major Resistance Genes in Barley Subpopulations Cultivated under Organic and Conventional Farming Systems. **Agronomy Research**, v. 19, n. 4, 1981–98, 2021.

SLAMET-LOEDIN, I. H.; JOHNSON-BEEBOUT, S. E.; IMPA, S.; TSAKIRPALOGLU, N. Enriching rice with Zn and Fe while minimizing Cd risk. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, n. 121, p. 1-9, 2015.

SOCIEDADE SUL BRASILEIRA DE ARROZ IRRIGADO. **Arroz irrigado: recomendações técnicas da pesquisa para o Sul do Brasil**. Pelotas, SOSBAI, 2016, 200 p.

SOSBAI. **ARROZ IRRIGADO: Recomendações Técnicas da Pesquisa para o Sul do Brasil XXXII REUNIÃO TÉCNICA DA CULTURA DO ARROZ IRRIGADO**. Sociedade Sul- Brasileira de Arroz Irrigado Cachoeirinha, RS, Brazil, 2018, 209 p.

SONTHEIMER, E. J.; BARRANGOU, R. The Bacterial Origins of the CRISPR Genome-Editing Revolution. **Human Gene Therapy**, v. 26, n. 7, p. 413-424, 2015.

SOLTANI, S. M.; CHALESHTORI, M. H.; TALAB, K. T.; VAHEB, H. S.; KATIGARI, M. S. Rice growth improvement, bio-fortification, and mitigation of macronutrient requirements through foliar application of zinc and iron- glycine chelate and zinc sulfate, **Journal of Plant Nutrition**, 2022.

SOUZA, J. M. O.; CARNEIRO, M. F. H., PAULELLI, A. C. C., GROTTTO, D.; MAGALHÕES JÚNIOR, A. M.; JÚNIOR, F. B.; BATISTA, B. L. Arsenic and rice: toxicity, metabolism, and food safety. **Química Nova**, v. 38, n.1, 2015.

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

SPEROTTO, R.; RICACHENEVSKY, F. K.; STEIN, R. J.; WALDOW, V.; FETT, J. P. Iron stress in plants: dealing with deprivation and overload. **Plant Stress**, v. 4, p. 57-69, 2010b.

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

SPEROTTO, R. A.; VASCONCELOS, M. W.; GRUSAK, M.A.; FETT, J. P. Effects of different Fe supplies on mineral partitioning and remobilization during the reproductive development of rice (*Oryza sativa* L.). **Rice**, v. 5, n. 27, p. 1-11, 2012b.

SODA, N.; VERMA, L.; GIRI, J. CRISPR-Cas9 based plant genome editing: Significance, opportunities and recent advances. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 131, p. 2-11, 2018.

STAFEN, C. F. **Caracterização de genótipos de arroz quanto aos teores de ferro e de zinco nos grãos e identificação de caracteres para a seleção indireta**. 2018. 97 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2018.

STANGOULIS, J. C. R.; HUYNH, B. L.; WELCH, R. M.; CHOI, E. Y.; GRAHAM, R. D. Quantitative trait loci for phytate in rice grain and their relationship with grain micronutrient content. **Euphytica**, v. 154, p. 289-294, 2007.

STEIN, J. C.; YU, Y.; COPETTI, D.; ZWICKL, D. J.; ZHANG, L.; ZHANG, C.; CHOUGULE, K.; GAO, D.; IWATA, A.; GOECOECHEA, J. L.; WEI, S.; WANG, J.; LIAO, Y.; WANG, M.; JACQUEMIN, J.; BECKER, C.; KUDRNA, D.; ZHANG, J.; LONDONO, C. E. M.; SONG, X.; LEE, S.; SANCHEZ, P.; ZUCCOLO, A.; AMMIRAJU, J. S. S.; TALAG, J.; DANOWITZ, A.; RIVERA, L. F.; GSCHWEND,

A. R.; NOUTSOS, C.; WU, C.; KAO, S.; ZENG, J.; WEI, F.; ZHAO, Q.; FENG, Q.; BAIDOURI, M. E.; CARPENTIER, M. LASSERRE, E.; COOKE, R.; FARIAS, D. R.; MAIA, L. C.; DOS SANTOS, R. S.; NYBERG, K. G.; MCNALLY, K. L.; MAULEON, R.; ALEXANDROV, N.; SCHMUTZ, J.; FLOWERS, D.; FAN, C.; WEIGEL, D.; JENA, K. K.; WICKER, T.; CHEN, M.; HAN, B.; HENRY, R.; HSING, Y. C.; KURATA, N.; DE OLIVEIRA, A. C.; PANAUD, O.; JACKSON, S. A.; MACHADO, C. A.; SANDERSON, M. J.; LONG, M.; WARE, D.; WING, R. A. Genomes of 13 domesticated and wild rice relatives highlight genetic conservation, turnover and innovation across the genus *Oryza*. **Nature Genetics**, v. 50, p. 285-296, 2018.

STRECK, E. A.; MAGALHÃES JUNIOR, A. M.; AGUIAR, G. A.; FACCHINELLO, P. K. H.; FAGUNDES, P. R. R.; FRANCO, D. F.; NARDINO, M.; COSTA DE OLIVEIRA, A. Genetic Progress in 45 Years of Irrigated Rice Breeding in Southern Brazil. **Crop Science**, v. 58, p. 1094-1105, 2018.

STROBBE, S.; VERSTRAETE, J.; STOVE, C.; STRAETEN, D. V. D. Metabolic engineering of rice endosperm towards higher vitamin B1 accumulation. **Plant Biotechnology Journal**, v.19, p. 1253-1267, 2021.

SUZUKI, M.; TAKAHASHI, M.; TSUKAMOTO, T.; WATANABE, S.; MATSUHASHI, S.; YAZAKI, J.; KISHIMOTO, N.; KIKUCHI, S.; NAKANISHI, H.; MORI, S.; NISHIZAWA, N. K. Biosynthesis and secretion of mugineic acid family phytosiderophores in zinc-deficient barley. **The Plant Journal**, v. 48, n. 1, p; 85-97, 2006.

SUZUKI, M.; MORIKAWA, K. C.; NAKANISHI, H.; TAKAHASHI, M.; SAIGUSA, M.; MORI, S.; NISHIZAWA, N. K. Transgenic rice lines that include barley genes have increased tolerance to low iron availability in a calcareous paddy soil. **Soil Science & Plant Nutrition**, v. 54, n. 1, p. 77-85, 2008.

SWAMY, B. M.; DESCALSOTA, G. I. L.; NHA, C. T.; AMPARADO, A.; INABANGAN-ASILO, M. A.; MANITO, C.; TESORO, F.; REINKE, R. Identification of genomic regions associated with agronomic and biofortification traits in DH populations of rice. **PloS one**, v. 13, n. 1. p. 1-20, 2018a.

SWAMY, B. P. M.; KALADHAR, K.; ANURADHA, K.; BATCHU, A. K.; LONGVAH, T.; SARLA, N. QTL Analysis for Grain Iron and Zinc Concentrations in Two *O. nivara* Derived Backcross Populations. **Rice Science**, v. 25, n. 4, p. 197-207, 2018b.

SWAMY, B. P. M.; MARATHI, B.; RIBEIRO-BARROS, A. I. F.; CALAYUGAN, M. I. C.; RICACHENEVSKY, F. K.; Iron Biofortification in Rice: An Update on Quantitative Trait Loci and Candidate Genes. **Frontiers in Plant Sciences**, v. 12, n. 647341, p. 1-11, 2021.

SUWARTO; NASRULLAH. Genotype × Environment Interaction for Iron Concentration of Rice in Central Java of Indonesia. **Rice Science**, v. 18, n. 1, p. 75-78, 2011.

TABASSUM, J.; AHMAD S.; HUSSAIN, B.; MAWIA, A. M.; ZEB, A.; JU, L. Applications and Potential of Genome-Editing Systems in Rice Improvement: Current and Future Perspectives. **Agronomy**, v. 11, n. 1359, p.1-24, 2021.

TAKAGI, S. Naturally occurring iron-chelating compounds in oat and rice-root washings. **Soil Science and Plant Nutrition**, v. 22, p. 423–433, 1976.

TALUKDAR, P.; NORTON, G. J.; TRAVIS, A. J.; HOSSAIN, M.; ISLAM, M. R.; PRICE, A. H. Identification of genomic loci regulating grain iron content in aus rice under two irrigation management systems. **Food Energy Security**, v. 11, p. e329, 2022.

TAN, Y.; SUN, L.; SONG, Q.; MAO, D.; ZHOU, J.; JIANG, Y.; WANG, J.; FAN, T.; ZHU, Q.; HUANG, D.; XIAO, H.; CHEN, C. Genetic architecture of subspecies divergence in trace mineral accumulation and elemental correlations in the rice grain. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 133, p. 529–545, 2020.

TANG, W.; DANG, F.; EVANS, D.; ZHONG, H.; XIAO, L. Understanding reduced inorganic mercury accumulation in rice following selenium application: Selenium application routes, speciation and doses. **Chemosphere**, v. 169, p. 369-376, 2017.

TAYLOR, P. G.; MARTINEZ, T. C.; ROMANO, E. L.; LAYRISSE, M. The effect of cysteine-containing peptides released during meat digestion on iron absorption in humans. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 43, n. 1, p. 68-71, 1986.

TERRA, T. G. R.; LEAL, T. C. A. B.; BORÉM, A.; RANGEL, P. H. N. Tolerância de linhagens de arroz de terras altas à seca. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 43, n.2, p. 201-208, 2013.

TERRES, A. L.; GALLI, J.; FAGUNDES, P. R. R.; MACHADO, M. O.; MAGALHÃES JUNIOR, A. M. de; MARTINS, J. F.; NUNES, C. D. M.; FRANCO, D. F.; AZAMBUJA, I. H. V. **Arroz irrigado no Rio Grande do Sul: generalidades e cultivares**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 1998, 58 p. (Embrapa Clima Temperado. Circular Técnica, 14).

TERRIN, G.; CANANI, R. B.; DI CHIARA, M.; PIETRAVALLE, A. Zinc in early life: A key element in the fetus and preterm neonate. **Nutrients**, v. 7, p.10427-10446, 2015.

THEIL, E. C. Ferritin: At the crossroads of iron and oxygen metabolism. **The Journal of Nutrition**, v. 133, p. 1549-1553, 2003.

THEIL, E.C. Iron homeostasis and nutritional iron deficiency. **The Journal of Nutrition**, v. 141, n. 4, p. 724S-728S, 2011.

THIMM, O.; ESSIGMANN, B.; KLOSKA, S.; ALTMANN, T.; BUCKHOUT, T. J. Response of Arabidopsis to iron deficiency stress as revealed by microarray analysis. **Plant Physiology**, v. 127, n. 3, p. 1030-1043, 2001.

THOMSON, M. J.; SINGH, N.; DWIYANTI, M. S.; WANG, D. R.; WRIGHT, M. H.; PEREZ, F. A.; DECLERCK, G.; CHIN, J. H.; MALITIC-LAYAOEN, G. A.; JUANILLAS, V. M.; DILLA-ERMITA, C. J.; MAULEON, R.; KRETZSCHMAR, T.; MCCOUCH, S. R. et al. Large-scale deployment of a rice 6 K SNP array for genetics and breeding applications. **Rice**, v. 10, n. 40, p. 1-13, 2017.

TILMAN, D.; BALZER, C; HILL, J.; BEFORT, B. L. Global food demand and the sustainable intensification of agriculture. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 50, p. 20260-20264, 2011.

TRIJATMIKO, K. R.; DUEÑAS, C.; TSAKIRPALOGLU, N.; TORRIZO, L.; ARINES, F. M.; ADEVA, C.; BALINDONG, J.; OLIVA, N.; SAPASAP, M. V.; BORRERO, J.; REY, J.; FRANCISCO, P.; NELSON, A.; NAKANISHI, H.; LOMBI, E.; TAKO, E.; GLAHN, R. P.; STANGOULIS, J.; CHADHA-MOHANTY, P.; JOHNSON, A. A. T.; TOHME, J.; BARRY, G.; SLAMET-LOEDIN, I. H. Biofortified indica rice attains iron and zinc nutrition dietary targets in the field. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1-13, 2016.

TRÖDER, S. E.; ZEVNIK, B. History of genome editing: From meganucleases to CRISPR. **Laboratory Animals**, v. 56, n. 1, p. 60-68, 2022.

TIWARI, S.; LATA, C. **Genome Engineering in Rice: Applications, Advancements and Future Perspectives**. Singh, S. P., Upadhyay, S. K., Pandey, A., & Kumar, S. (Eds.). Molecular Approaches in Plant Biology and Environmental Challenges. Energy, Environment, and Sustainability. Springer Nature Singapore Pte Ltd. 2019; v. 15, p. 323-327, 2019.

TONG, M.; LIU, X.; GUAN, J.; LIN, Y.; ZHOU, A.; QIAO, K. Novel biofortification candidate: MTP1 increases microelement contents and decreases toxic heavy metal accumulation in grains. **Chemosphere**, v. 318, p. 137967, 2023.

UNDERWOOD, E. J.; SUTTLE, N. F. **The mineral nutrition of livestock**. 3rd ed. Wallingford: CABI International Publishing, 1999, p. 614.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. **Vitamins and minerals**. US Department of Agriculture, National Agricultural Library, 2016.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. **Publications rice**. Disponível em: <http://www.ers.usda.gov>. Acesso em 15 de dezembro de 2022.

UAUY, R.; HERTRAMPF, E.; REDDY, M. Iron fortification of foods: overcoming technical and practical barriers. **The Journal of Nutrition**, v. 132, n. 4, p. 849S-52S, 2002.

VANDEPOELE K.; QUIMBAYA M.; CASNEUF T.; VEYLDER L.; VAN DE PEER Y. Unraveling Transcriptional Control in Arabidopsis Using cis-Regulatory Elements and Coexpression Networks. **Plant Physiology**, v.150, p. 535–546, 2009.

VASCONCELOS, M.; DATTA, K.; OLIVA, N.; KHALEKUZZAMAN, M.; TORRIZO, L.; KRISHNAN, S.; OLIVEIRA, M.; GOTO, F.; DATTA, S. K. Enhanced iron and zinc accumulation in transgenic rice with the ferritin gene. **Plant Science**, v. 164, n. 3, p. 371-378, 2003.

VASCONCELOS, M. J. V.; FIGUEIREDO, J. E. F. Tecnologia CRISPR-Cas para Edição de Genômica. **Embrapa Milho e Sorgo**, 2015, 39 p. (Documento 197).

VASCONCELOS, M. W.; GRUISSEM, W.; BHULLAR, N. K. Iron biofortification in the 21st century: setting realistic targets, overcoming obstacles, and new strategies for healthy nutrition. **Current opinion in biotechnology**, v. 44, p. 8-15, 2017.

VAHL, L.C. **Toxidez de ferro em genótipos de arroz irrigado por alagamento**. 1991. 173p. Tese (Doutorado em Solos) Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1982.

VANNOTTI, A.; DELACHAUX, A. **Iron Metabolism and Its Clinical Significance**. New York: Grune and Stratton, 267 p., 1949.

VARSHNEY, R. K.; THIEL, T.; SRETENOVIC-RAJICIC, T.; BAUM, M.; VALKOUN, J.; GUO, P.; GRANDO, S.; CECCARELLI, S.; GRANER, A. Identification and validation of a core set of informative genic SSR and SNP markers for assaying functional diversity in barley. **Molecular Breeding**, v. 22, p. 1-13, 2008.

VAUGHAN, D. A.; MORISHIMA, H.; KADOWAKI, K. Diversity in the *Oryza* genus. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 6, n. 2, p. 139-146, 2003.

VAUGHAN, D. A.; LU, B. R.; TOMOOKA, N. The evolving story of rice evolution. **Plant Science**, v. 174, p.394-408, 2008.

VAZQUEZ-VILAR, M.; BERNABÉ-ORTS, J. M.; FERNANDEZ-DELCARMEN, A.; ZIARSOLO, P.; BLANCA, J.; GRANELL, A.; ORZAEZ, D. A modular toolbox for gRNA–Cas9 genome engineering in plants based on the GoldenBraid standard. **Plant Methods**, v. 12, p. 10, 2016.

VELU, G.; ORTIZ-MONASTERIO, I.; CAKMAK, I.; HAO, Y.; SINGH, R. P. Biofortification strategies to increase grain zinc and iron concentrations in wheat. **Journal of Cereal Science**, v. 59, n. 3, p. 365-372, 2014.

VENSKE, E.; STAFEN, C. F.; DE OLIVEIRA, V. F.; DA MAIA, L. C.; DE MAGALHÃES JUNIOR, A. M.; MCNALLY, K. L.; DE OLIVEIRA, A. C.; PEGORARO, C. Genetic diversity, linkage disequilibrium, and population structure in a panel of Brazilian rice accessions. **Journal of Applied Genetics**, v. 60, p. 27-31, 2019.

VIANA, V. E.; PEGORARO, C.; BUSANELLO, C.; DE OLIVEIRA, A. C. Mutagenesis in Rice: The Basis for Breeding a New Super Plant. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, n. 1326, p. 1-28, 2019.

VIANA, V. E.; MALTZAHN, L. E.; DE OLIVEIRA, A. C.; PEGORARO, C. Genetic Approaches for Iron and Zinc Biofortification and Arsenic Decrease in *Oryza sativa* L. Grains. **Biological Trace Element Research**, v. 200, p. 4505-4523, 2022.

VIRMANI, S. S.; LLYAS-AHMED, M. **Rice breeding for sustainable production**. In: Breeding Major Food Staples. Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd; 2008. pp. 141-191.

VON-WIREN, N.; KHODR, H.; HIDER, R.C. Hydroxylated phytosiderophore species possess an enhanced chelate stability and affinity for iron(III). **Plant Physiology**, v. 124, n. 3, p. 1149–1158, 2000.

VRANKA, J. A.; SAKAI, L. Y.; BACHINGER, H. P. Prolyl 3 hydroxylase 1: enzyme characterization and identification of a novel family of enzymes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 22, p. 23615-23621, 2004.

VREUGDENHIL, D.; AARTS, M. G. M.; KOORNNEEF, M.; NELISSEN, H.; ERNST, W. H. O. Natural variation and QTL analysis for cationic mineral content in seeds of *Arabidopsis thaliana*. **Plant, Cell and Environment**, v. 27, n. 7, p. 828-839, 2004.

WANG, C-H.; ZHENG, X-M.; XU, Q.; YUAN, X-P.; HUANG, L.; ZHOU, H-F.; WEI, X-H.; GE, S. Genetic diversity and classification of *Oryza sativa* with emphasis on Chinese rice germplasm. **Heredity**, v. 112, p. 489-496, 2014.

WANG, W.; YE, J.; MA, Y.; WANG, T.; SHOU, H.; ZHENG, L. *OsIRO3* Plays an Essential Role in Iron Deficiency Responses and Regulates Iron Homeostasis in Rice. **Plants**, v. 9, n. 1095; p. 1-14, 2020a.

WANG, S.; LI, L.; YING, Y.; WANG, J.; SHAO, J. F.; YAMAJI, N.; WHELAN, J.; MA, J. F.; SHOU, H. A transcription factor *OsbHLH156* regulates Strategy II iron acquisition through localizing IRO2 to the nucleus in rice. **New Phytologist**, v. 225, p. 1247-1260, 2020b.

WANI, A. L.; ARA, A.; USMANI, J. A. Lead toxicity: A review. **Interdisciplinary Toxicology**, v. 8, n. 2, p. 55-64, 2015.

WAIRICH, A.; OLIVEIRA, B. H. N.; AREND, E. B.; DUARTE, G. L.; PONTE, L. R.; SPEROTTO, R. A.; RICACHENEVSKY, F. K.; FETT, J. P. The combined Strategy for iron uptake is not exclusive to domesticated rice (*Oryza sativa*). **Scientific Reports**, v. 9, n. 16144, p. 1-17, 2019.

WAIRICH, A.; RICACHENEVSKY, F.; K.; LEE, S. K. A tale of two metals: Biofortification of rice grains with iron and zinc. **Frontiers in Plant Science**, v. 13, 2022.

WALKER, E. L.; CONNOLLY, E. L. Time to pump iron: iron-deficiency-signaling mechanisms of higher plants. **Current opinion in biotechnology**, v. 11, n. 5, p. 530-535, 2008.

WATANABE, Y. Genomic constitution of genus *Oryza sativa*. In: MATSOU, T, et al. (Ed.) **Science of the Rice Plant: Genetics**. Tokyo: Food and Agriculture Policy Research Center, v.3, p. 29-39, 1997.

WEEKS, D. P.; SPALDING, M. H.; YANG, B. Use of designer nucleases for targeted gene and genome editing in plants. **Plant Biotechnology Journal**, v. 14, n.2, p. 483-495, 2016.

WEI, Y.; SHOHAG, M. J. I.; YANG, X.; ZHANG, Y. Effects of foliar iron application on iron concentration in polished rice grain and its bioavailability. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 45, p. 11433-11439, 2012.

WEI, J.; WANG, A.; LI, R.; QU, H.; JIA, Z. Metabolome-wide association studies for agronomic traits of rice. **Heredity**, v. 120, p. 342-355, 2018.

WEI, X.; HUANG, X. **Origin, taxonomy, and phylogenetics of rice. Rice (Fourth Edition)**. Chemistry and Technology, p. 1-29, 2019.

WELCH, R.M. Breeding strategies for biofortified staple plant foods to reduce micronutrient malnutrition globally. **The Journal of Nutrition**, v. 132, n. 3, 495S–499S, 2002.

WELCH, R. M.; GRAHAM, R. D. Breeding for micronutrients in staple food crops from a human nutrition perspective. **Journal of Experimental Botany**, v. 55, n. 396, p. 353-364, 2004.

WELLMER F.; RIECHMANN J.L. Gene network analysis in plant development by genomic technologies. **International Journal of Developmental Biology**, v.49, p.745–759, 2005.

WEN, W.; MEI, H.; FENG, F.; YU, S.; HUANG, Z.; WU, J.; CHEN, L.; XU, X.; LUO, L. Population structure and association mapping on chromosome 7 using a diverse panel of chinese germplasm of rice. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 119, p. 459-470, 2009.

WESSLING-RESNICK, M. **Iron: Basic Nutritional Aspects**. In: Molecular, Genetic, and Nutritional Aspects of Major and Trace Minerals. p. 161- 173, 2017.

WESTPORT, C. T. **Nutrition in first 1,000 days: the state of the world's mothers 2012**. Westport, CT: Save the Children. p.16, 2012.

WHITING, S. J.; BARABASH, W. A. Dietary reference intakes for the micronutrients: considerations for physical activity. **Applied Physiology, Nutrition and Metabolism**, v. 31, n.1, p. 80-85, 2006.

WHO/FAO. **Vitamin and mineral requirements in human nutrition**. World Health Organization. Report of a joint FAO/WHO expert consultation, Bangkok, Thailand, 1998.

WIEDENHEFT, B.; STERNBERG, S. H.; DOUDNA, J. A. RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea. **Nature**, v. 482, n. 7385, p.331-338, 2012.

WIN, K.T.; YAMAGATA, Y.; DOI, K.; UYAMA, K.; NAGAI, Y.; TODA, Y.; KANI, T.; ASHIKARI, M.; YASUI, H.; YOSHIMURA, A. A single base change explains the independent origin of and selection for the non shattering gene in African rice domestication. **New Phytologist**, v. 213, p.1925-1935, 2016.

WIRTH, J.; POLETTI, S.; AESCHLIMANN, B.; YAKANDAWALA, N.; DROSSE, B.; OSORIO, S.; TOHGE, T.; FERNIE, A. R.; GÜNTHER, D.; GRUISSEM, W.; SAUTTER, C. 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.

WREGE, M. S.; STEINMETZ, S.; JÚNIOR, C. R.; DE ALMEIDA, I. R. **ATLAS CLIMÁTICO DA REGIÃO SUL DO BRASIL**. v. 2ª edição, 2012, 334 p.

WOOD, R. J.; RONNENBERG, A. **Iron**. In: Shils ME, Shike M, Ross AC, Caballero B, Cousins RJ, editors. *Modern Nutrition in Health and Disease*. 10 ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins. p. 248-270, 2005.

World Health Organization. **WHO Micronutrient deficiencies**, 2015. Disponível em: <http://www.who.int/nutrition/topics/ida/e>. Acesso em 14 de abril de 2020.

WU, L.; SHHADI, M. Y.; GREGORIO, G.; MATTHUS, E.; BECKER, M.; FREI, M. Genetic and physiological analysis of tolerance to acute iron toxicity in rice. **Rice**, v. 7, n. 8, p. 1-12, 2014.

XIE, K.; MINKENBERG, B.; YANG, Y. Boosting CRISPR/Cas9 multiplex editing capability with the endogenous tRNA-processing system. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 11, p. 3570-3575, 2015.

XU, F.; SUN, C.; HUANG, Y.; CHEN, Y.; TONG, C.; BAO, J. QTL mapping for rice grain quality: a strategy to detect more QTLs within sub-populations. **Molecular Breeding**, v. 35, n. 105, p. 1-11, 2015.

XUE, Y.; MARTELLO, R. D. QIN, L. STEVENS, C. J.; MIN, R.; QIAN, D. Q. F. Post-Neolithic broadening of agriculture in Yunnan, China: Archaeobotanical evidence from Haimenkou. **Archaeological Research in Asia**, v. 30, p. 100364, 2022.

YADAV, S.; SINGH, A.; SINGH, M. R.; GOEL, N.; VINOD, K. K.; MOHAPATRA, T.; SINGH, A. K. Assessment of genetic diversity in Indian rice germplasm (*Oryza sativa* L.): use of random versus trait-linked microsatellite markers. **Journal of genetics**, v. 92, p. 545–557, 2013.

YADAV, P.; SINGH, B.; GARG, V. K.; MOR, S; PULHANI, V. Bioaccumulation and health risks of heavy metals associated with consumption of rice grains from croplands in Northern India. **Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal**, v. 23, n. 1, p. 14-27, 2017.

YAN, W.; KANG, M. S. **GGE Biplot Analysis; A Graphical Tool for Breeders, Geneticists, and Agronomists**. CRC Press, editora: New York, 2003, 32 p.

YAN, Y. P.; HE, J-Y.; ZHU, C.; CHENG, C.; PAN, X-B.; SUN, Z-Y.  
Accumulation of copper in brown rice and effect of copper on rice growth and grain yield in different rice cultivars. **Chemosphere**, v. 65, n. 10, p. 1690-1696, 2006.

YANG, W.; GUO, Z.; HUANG, C.; DUAN, L.; CHEN, G.; FANG, W.; FENG, H.; XIE, W.; LIAN, X.; WANG, G.; LUO, Q.; ZHANG, Q.; LIU, Q.; XIONG, L.  
Combining high-throughput phenotyping and genome-wide association studies to reveal natural genetic variation in rice. **Nature Communications**, v. 5, n. 5087, p. 1-9, 2014.

YANG, Q. Q.; ZHANG, C-Q.; CHAN, M-L.; ZHAO, D-S.; CHEN, J-Z.; WANG, Q.; LI, Q-F.; YU, H-X.; GU, M-H.; SUN, S. S-M.; LIU, Q-Q. Biofortification of rice with the essential amino acid lysine: Molecular characterization, nutritional evaluation, and field performance. **Journal of Experimental Botany**, v. 67, n. 14, p. 4285-4296, 2016.

YANG, J.; LUO, D.; YANG, B.; FROMMER, W. B.; EOM, J. S. *SWEET 11* and *15* as key players in seed filling in rice. **New Phytologist**, v. 218, n. 2, p. 604-615, 2018a.

YANG, M.; LU, K.; ZHAO, F-J.; XIE, W.; RAMAKRISHNA, P.; WANG, G.; DU, Q.; LIANG, L.; SUN, C.; ZHAO, H.; ZHANG, Z.; LIU, Z.; TIAN, J.; HUANG, X-Y.; WANG, W.; DONG, H.; HU, J.; MING, L.; XING, Y.; WANG, G.; XIAO, J.; SALT, D. E.; LIAN, X. Genome-Wide Association Studies Reveal the Genetic Basis of Ionomic Variation in Rice<sup>[open]</sup>. **The Plant Cell**, v. 30, p. 2720-2740, 2018b.

YAO, B. M.; CHEN, P.; SUN, G. X. Distribution of elements and their correlation in bran, polished rice, and whole grain. **Food Science and Nutrition**, v. 8, p. 982-992, 2020.

YIM, S. R.; PARK, G. Y.; LEE, K. W.; CHUNG, M-S.; SHIM, S-M. Determination of total arsenic content and arsenic speciation in different types of rice. **Food Science and Biotechnology**, v. 26, n. 1, p. 293-298, 2017.

YONEYAMA, T.; ISHIKAWA, S.; FUJIMAKI, S. Route and Regulation of Zinc, Cadmium, and Iron Transport in Rice Plants (*Oryza sativa* L.) during Vegetative Growth and Grain Filling: Metal Transporters, Metal Speciation, Grain Cd Reduction and Zn and Fe Biofortification. **International Journal of Molecular Science**, v. 16, n. 8, 19111-19129, 2015.

YOUNAS, N.; FATIMA, I.; AHMAD, I. A.; AYYAZ, M. K. Alleviation of zinc deficiency in plants and humans through an effective technique; biofortification:

A detailed review. **Acta Ecologica Sinica**, 2022.

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

YU, J.; BUCKLER, E. S. Genetic Association mapping and genome organization of maize. **Current Opinion in Biotechnology**, New York, v. 17, p. 155-160, 2006.

YU, P.; WANG, C. H.; XU, Q.; FENG, Y.; YUAN, X. P.; YU, H. Y.; WANG, Y-P.; TANG, S-X.; WANG, Y-P.; TANG, S-X.; WEI, X. H. Genome-wide copy number variations in *Oryza*. **BMC Genomics**, v. 14, n. 1, p. 1, 2013.

YUAN, L.; WU, L.; YANG, C.; LV, Q. Effects of iron and zinc foliar applications on rice plants and their grain accumulation and grain nutritional quality. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, n. 2, p. 254-261, 2013.

ZAFARZADEH, A.; BAY, A.; FAKHRI, Y.; KERAMATI, H.; HOSSEINI POUYA, R. Heavy metal (Pb, Cu, Zn, and Cd) concentrations in the water and muscle of common carp (*Cyprinus carpio*) fish and associated non-carcinogenic risk. **Toxin Reviews**, v. 36, p. 331-341, 2017.

ZAGHUM, M. J.; ALI, K.; TENG, S.; Integrated Genetic and Omics Approaches for the Regulation of Nutritional Activities in Rice (*Oryza sativa* L.). **Agriculture**, v. 12, n. 11, p. 1-17, 2022.

ZAW, H.; RAGHAVAN, C.; POCSEDIO, A.; SWAMY, P. M.; JUBAY, M. L.; SINGH, R. K.; BONIFACIO, J.; M, AULEON, R.; HERNANDEZ, J. E.; MENDIORO, M. S.; GREGORIO, G. B.; LEUNG, H. Exploring genetic architecture of grain yield and quality traits in a 16- way *indica* by *japonica* rice MAGIC global population. **Scientific Reports**, v. 9, n. 196052019, 2019.

ZEBEC, V.; LISJAK, M.; JOVIĆ, J.; KUJUNDŽIĆ, T.; RASTIJA, D.; LONČARIĆ. Vineyard Fertilization Management for Iron Deficiency and Chlorosis Prevention on Carbonate Soil. **Horticulturae**, v. 7, n. 9, 285, 2021.

ZHANG W.; RUAN J.; HO T.D.; YOU Y.; YU T.; QUATRANO R.S.; Cis-regulatory element based targeted gene finding: genome-wide identification of abscisic acid and abiotic stress-responsive genes in *Arabidopsis thaliana*. **Bioinformatics**, v.21 n.14, p.3074–3081, 2005.

ZHANG, Y.; XU, Y. H.; YI, H. Y.; GONG, J. M. Vacuolar membrane transporters OsVIT1 and OsVIT2 modulate iron translocation between flag leaves and seeds in rice. **The Plant Journal**, v. 72, n. 3, p. 400-410, 2012.

ZHANG, M.; PINSON, S.R.M.; TARPLEY, L.; HUANG, X.Y.; LAHNER, B.; YAKUBOVA, E.; BAXTER, I.; GUERINOT, M.L.; SALT, D.E. Mapping and validation of quantitative trait loci associated with concentrations of 16 elements in unmilled rice grain. **Theoretical and applied genetics**, v. 127, p. 137-165, 2014.

ZHANG, Y.; LIANG, Z.; ZONG, Y.; WANG, Y.; LIU, J.; CHEN, K.; QIU, J-L.; GAO, C. Efficient and transgene-free genome editing in wheat through transient expression of CRISPR/Cas9 DNA or RNA. **Nature Communications**, v. 7, n. 12617, p. 1-8, 2016.

ZHANG, G. M.; ZHENG, T-Q.; CHEN, T.; WANG, Y-L.; WANG, Y.; SHI, Y-M.; WANG, C-C.; ZHANG, L-Y.; MA, J-T.; DENG, L-W.; LI, W.; XU, T-T.; LIANG, C-Z.; XU, J-L.; LI, Z-K. Joint exploration of favorable haplotypes for mineral concentrations in milled grains of rice (*Oryza sativa* L.). **Frontiers in Plant Science**, v. 9, n. 447, p. 1-14, 2018.

ZHANG, B.; WEI, Y.; YAN, S.; SHI, H.; NIE, Y.; ZOU, G.; ZHANG, X.; LUO, L. Characterization of selenium accumulation of different rice genotypes in Chinese natural seleniferous soil. **Plant, Soil and Environment**, v. 65, p. 15-20, 2019.

ZHANG, Y.; PRIBIL, M.; PALMGREN, M.; GAO, C. A CRISPR way for accelerating improvement of food crops. **Nature Food**, v. 1, n. 4, pp.200-205, 2020.

ZHAO, F. J.; WANG, P. Arsenic and cadmium accumulation in rice and mitigation strategies. **Plant and Soil**, v. 446, p.1-21, 2020.

ZHAO, Y.; N.; LI, C.; LI, H.; LIU, X. S.; YANG, Z. M. *OsZIP11* is a trans-Golgi-residing transporter required for rice iron accumulation and development. **Gene**, v. 836, p. 146678, 2022.

ZHENG, L.; HUANG, F.; NARSAI, R.; WU, J.; GIRAUD, E.; HE, F.; CHENG, L.; WANG, F.; WU, P.; WHELAN, J.; SHOU, H. Physiological and Transcriptome Analysis of Iron and Phosphorus Interaction in Rice Seedlings. **Plant Physiology**, v. 151, n. 1, p. 262-274, 2009.

ZHENG, L.; YING, Y.; WANG, L.; WANG, F.; WHELAN, J.; SHOU, H. Identification of a novel iron regulated basic helix-loop-helix protein involved in Fe homeostasis in *Oryza sativa*. **BMC Plant Biology**, v. 10, n. 166, p. 1-9, 2010.

ZHOU, X.; YANG, J.; KRONZUCKER, H. J.; SHI, W. Selenium Biofortification and Interaction With Other Elements in Plants: A Review. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, p. 586421, 2020.

ZHOU, X-Q.; CHEN, D-G.; GUO, J.; CHEN, P-L.; LI, L-J.; CHEN, K.; CHEN, Y-D.; LIU, C-G.; ZHANG, Z-M. Genetic improvement of grain quality traits in *indica* inbred rice cultivars developed in South China during 1956–2020. **Euphytica**, v. 218, n. 8, 2022.

ZHU, T.; XU, P. Z.; LIU, J. P.; PENG, S.; MO, X. C.; GAO, L. Z. Phylogenetic relationships and genome divergence among the AA- genome species of the genus *Oryza* as revealed by 53 nuclear genes and 16 intergenic regions. **Molecular Phylogenetic and Evolution**, v. 70, p. 348-361, 2014.

ZHU, C.; BORTESI, L.; BAYSAL, C.; TWYMAN, R. M.; FISCHER, R.; CAPELL, T.; SCHILLBERG, S.; CHRISTOU, P. Characteristics of Genome Editing Mutations in Cereal Crops. **Trends in Plant Science**, v. 22, n. 1, p. 38-52, 2017.

ZHU, H.; LI, C.; GAO, C. Applications of CRISPR–Cas in agriculture and plant biotechnology. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 21, n. 11, p.661-677, 2020.

ZIELIŃSKA-DAWIDZIAK, M. Plant ferritina source of iron to prevent its deficiency. **Nutrients**, v. 7, n. 2, p. 1184-1201, 2015.

ZINGORE, S.; DELVE, R. J.; NYAMANGARA, J.; GILLER, K. E. Multiple benefits of manure: The key to maintenance of soil fertility and restoration of depleted sandy soils on African smallholder farms. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, v. 80, n. 3, p. 267-282, 2008.

ZOU, X-H.; ZHANG, F-M.; ZHANG, J-G.; ZANG, L-L.; TANG, L.; WANG, J.; SANG, T.; GE, S. Analysis of 142 genes resolves the rapid diversification of the rice genus. **Genome Biology**, v. 9, n.3, p. R49.1-R49.13, 2008.

ZOU, C.; SUN, K.; MACKALUSO, J. D.; SEDDON, A. E.; JIN, R.; THOMASHOW, M. F.; SHIU, S. Cis-regulatory code of stress-responsive transcription in *Arabidopsis thaliana*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 108, pp. 14992-14997, 2011.

## VITAE

Victoria Freitas de Oliveira, nasceu em 04 de abril de 1995, filha de Antonio Costa de Oliveira e Carla Sampaio Freitas de Oliveira, natural de Lafayette, Indiana, Estados Unidos da América. Em março de 2012 ingressou na Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel (FAEM/UFPel), e no mesmo mês em 2012 iniciou estágio no Centro de Genômica e Fitomelhoramento (CGF), permanecendo até julho de 2016. Tornou-se bolsista FAPERGS de agosto 2012 até julho 2014 e do CNPq de agosto de 2014 até julho 2016. Em agosto de 2016 iniciou o estágio curricular obrigatório do curso de Agronomia na empresa Biotrigo Genética Ltda., localizada em Passo Fundo, no Rio Grande do Sul, com término das atividades em dezembro de 2016. Obteve o título de Engenheira Agrônoma em janeiro de 2017. Em fevereiro de 2017 foi selecionada em primeiro lugar para ingressar no curso de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Fitomelhoramento. Obteve o título de mestre em fevereiro de 2019, e começou o doutorado no curso de Pós-Graduação em Agronomia no ano de 2019 que também foi selecionada em primeiro lugar. Em junho de 2021 foi selecionada pelo programa doutorado sanduíche pela CAPES para ir para Milão, Itália e permaneceu por seis meses, de novembro de 2021 até abril de 2022, na Università Degli Studi di Milano (UNIMI). Neste período atuou na condução do campo experimental, hidroponia, biologia molecular e biotecnologia na cultura de arroz, do programa de melhoramento do CGF, auxiliando alunos de graduação na execução de tarefas. Durante sua trajetória acadêmica-científica, publicou na qualidade de autor e co-autor 49 resumos, 1 capítulo de livro e 22 artigos científicos em periódicos na área de melhoramento genético de plantas. Desde julho de 2022, começou trabalho voluntário, como pesquisadora voluntária remoto, em um ONG na Argentina, conhecida como Hecho por Nosotros. Atua como colaboradora no projeto de Programa de alimentos, com o foco em microbiologia do solo e agricultura regenerativa, para aperfeiçoar o sistema de produção e ajudar a disseminar conhecimentos para produtores locais.