

GISELLE CAMARGO MENDES

EFEITO AMBIENTAL E GENOTÍPICO NO TEOR DE NUTRIENTES
ACUMULADOS EM SEMENTES DE ARROZ,
Oryza sativa

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de
Viçosa, como parte das
exigências do Programa de
Pós-Graduação em Fisiologia
Vegetal, para obtenção do
título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2009

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

M538e
2009

Mendes, Giselle Camargo, 1983-

Efeito ambiental e genotípico no teor de nutrientes
acumulados em sementes de arroz, *Oryza sativa* / Giselle
Camargo Mendes. – Viçosa, MG, 2009.
viii, 91f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Inclui anexos.

Orientador: Andréa Miyasaka de Almeida.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Arroz - Melhoramento genético. 2. *Oryza sativa*.
 3. Arroz - Semente - Teor de ferro. 4. Espectrometria de massa. 5. Gramínea. I. Universidade Federal de Viçosa.
- II. Título.

CDD 22.ed. 633.183

GISELLE CAMARGO MENDES

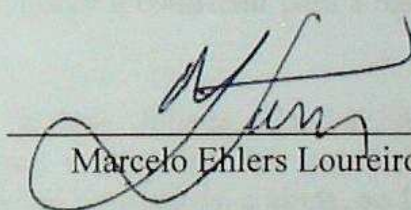
EFEITO AMBIENTAL E GENOTÍPICO NO TEOR DE NUTRIENTES
ACUMULADOS EM SEMENTES DE ARROZ,
Oryza sativa

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de
Viçosa, como parte das
exigências do Programa de
Pós-Graduação em Fisiologia
Vegetal, para obtenção do
título de *Magister Scientiae*.

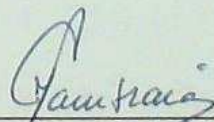
APROVADA: 20 de março de 2009.



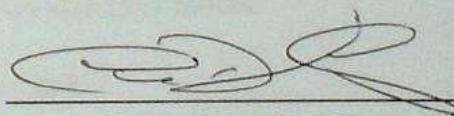
Antônio Costa de Oliveira
(Coorientador)



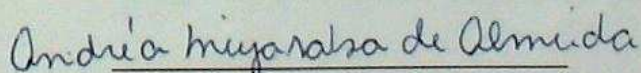
Marcelo Ehlers Loureiro



José Cambráia



Cosme Damião Cruz


Andréa Miyasaka de Almeida
(Orientadora)

AGRADECIMENTOS

A Deus por sempre guiar meus caminhos e nunca me fazer perder a fé.

Ao programa de pós-graduação em Fisiologia Vegetal da UFV pela oportunidade de realizar o sonho de fazer o mestrado neste programa.

A professora Andréa Miyasaka de Almeida pelos ensinamentos, pela orientação, pelas oportunidades e pela confiança. Muito obrigada por tudo o que você representou para mim durante esses dois anos.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG - pela concessão da bolsa de estudos e pelo financiamento do projeto.

A CAPES-PROCAD pelo financiamento do projeto e por permitir a realização do estágio na UFPel.

Aos companheiros de trabalho do projeto arroz: Carlos, Eduardo, Laíse, Pitt, Gustavo, Daniel e Camilo, pelas maravilhosas horas de trabalho em que tivemos juntos. Todos vocês tem uma grande participação neste trabalho e quero deixar registrado como vocês foram importantes durante a execução desse projeto em todos os momentos. **MUITO OBRIGADA !!!**

À Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais – EPAMIG – por todo o apoio na execução do experimento de campo. Eu quero agradecer ao Plínio, Jardel, Sartunino e tia Betinha por estarem envolvidas direta e indiretamente neste trabalho. Em especial eu quero agradecer ao Felipe, pela ajuda, obrigada por sempre estar disposto a nos ajudar e contribuir para a melhora deste trabalho.

Ao professor Antônio Costa Oliveira, eu quero agradecer em especial pela oportunidade de fazer estágio em seu laboratório, por sempre me ajudar e contribuir para a realização desse trabalho. Muito obrigada por tudo!

Ao grupo de pesquisa do laboratório do professor Antônio: Juliana, Claudete, Adriana, Renata, Naciele, Tatiana, Clauber, Daniel, Anurag e Maraísa. Em especial quero agradecer ao Gustavo e Guilherme pelas ajudas com as estatísticas, e ainda, ao Luciano (Paulista) e a Denise por serem mais que companheiros de trabalho, e sim, amigos de verdade que sempre me ajudaram durante minha estadia em Pelotas.

Ao Fernando e Liliane da UFPEL que foram importantes.

A Juliana, por me apresentar a uma família maravilhosa que agora se tornou minha segunda família. Eu quero agradecer de coração pela acolhida de vocês, além de terem me ajudado a superar a saudade de casa, vocês me proporcionaram momentos muito felizes. Eu agradeço a Deus por ter conhecido cada um de vocês.

Ao Valdir por sempre me ajudar, você foi muito importante para a realização desse trabalho, muito obrigada.

A Carla por sempre estar presente e me aconselhar. Nós estivemos juntas desde a graduação e foi muito importante você participar também na realização desse sonho.

Aos companheiros de laboratório: Werner, Ivan, Àguida, Sabrina, Humberto e Luciana. Em especial eu quero agradecer a Rita e ao Francis, por serem pessoas muito queridas para mim.

A Mercês pelo apoio.

Ao professor Cosme Damiano por nos ajudar com as análises estatísticas.

Ao professor Marco Antônio Oliva pela co-orientação e por permitir a utilização da UCP.

Ao professor Jaime Mello pela ajuda com as análises de solos.

Ao professor Paulo Peixoto da UFJF por sempre me apoiar e estar sempre me incentivando nas minhas decisões.

Aos meus amigos: Letícia, Lucas, Iulla, Alan, Danilo, Caroline, Teresa, Moises, Clenilso por estarem sempre presentes durante essa caminhada e na realização de um sonho. **MUITO OBRIGADA** por tudo o que cada um de vocês representa para mim.

As minhas amigas: Luísa, Daniela, Vanessa, Jaqueline que foram importantes por estarem sempre presentes.

As minhas amigas: Luciana, Roberta, Isabela, Máira e Virgínia, que mesmo de longe são extremamente importantes da minha vida.

A Thalita que foi mais que uma amiga, ela é uma irmã de verdade que esteve presente a cada momento da minha vida durante esses dois anos. Eu agradeço a Deus por ter colocado você no meu caminho. Obrigada por tudo!

A minha família maravilhosa: meus pais José e Marlene, e meus irmãos queridos: Menderson e Jefferson.

Obrigada todos aqueles que me ajudaram na execução desse trabalho.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIACÕES.....	vi
RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	ix
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	11
CAPITULO 1	
RESUMO.....	16
ABSTRACT.....	17
INTRODUÇÃO.....	18
MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
Estações experimentais.....	20
Determinação do teor de ferro em sementes de arroz pela técnica de espectrometria de massas com fonte de plasma indutivamente acoplado (ICP-MS)....	21
Análise do teor de ferro nos tecidos.....	21
Análise de solos.....	22
Extração de RNA, síntese de cDNA e RT-PCR em tempo real (qRT-PCR).....	22
Análises estatísticas.....	23
RESULTADOS.....	24
Análise dos solos dos locais de cultivo em Minas Gerais e Rio Grande do Sul.....	24
Potencial genético e variabilidade dos cultivares de arroz.....	25
Teor de ferro nos tecidos.....	32
Análise de correlação entre os nutrientes acumulados nas sementes.....	34
Análise de expressão gênica.....	36
DISCUSSÃO.....	37
CONCLUSÕES.....	44
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61
CAPITULO 2	
RESUMO.....	67
ABSTRACT.....	68
INTRODUÇÃO.....	69
Gramíneas e Arroz como genoma modelo.....	70

MATERIAIS E MÉTODOS.....	73
Obtenção de seqüências	73
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	75
NAS (Nicotianamina Sintase).....	75
ZIP (Zinc Iron Protein).....	76
NRAMP (Natural Resistance Associated Macrophage Protein).....	77
FER (Ferritina).....	78
YSL (Yellow Stripe Like).....	78
FRO (ferro redutase oxidase).....	80
Alinhamentos dos genes endosperma de milho.....	84
CONCLUSÕES.....	84
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	89

LISTA DE ABREVIATURAS

AHA: Próton ATPases
AGP: ADP glicose pirofosforilase
BLAST: Ferramenta de pesquisa de alinhamento local básico
EST: Sequência alvo expressa
FER: Ferritina
FRO: Ferro Redutase Oxidase
FS: Fitosiderósforos
GFP: Proteína Fluorescente verde
GUS: β -glucoronidase
IRT: Transportador de ferro
IRGSP: Projeto Internacional da Sequencia do genoma do arroz
KOME: Knowledge based Oryza molecular biological cyclopedia
MA: Acido mugineico
NAAT: Nicotianamina aminotransferase
NADPH: Adenina dinucleotídio-fosfato
NCBI: Centro Nacional de informação em biotecnologia
NRAMP: Proteína natural associada a resistência a macrófago
SAM: S-adenosil metionina
SS: Amido sintase
VIT: Transportador vacuolar de ferro
ZIP: Proteína transportadora de zinco e ferro
YS: Yellow stripe
YSL: Yellow stripe like

RESUMO

MENDES, Giselle Camargo, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2009.
Efeito ambiental e genotípico no teor de nutrientes em sementes de arroz, *Oryza sativa*. Orientadora: Andréa Miyasaka de Almeida. Co-orientadores: Antônio Costa de Oliveira e Marco Antonio Oliva Cano.

As plantas adquiriram estratégias I e II de absorção do ferro. A estratégia I ocorre em plantas terrestres e inclui a redução do ferro da forma férrica (Fe^{+3}) para a forma ferrosa (Fe^{+2}). A estratégia II de absorção de ferro está presente nas gramíneas e é caracterizada pela liberação de fitosideróforos no ambiente que se complexam ao íon férrico. O processo de enchimento do grão em cereais envolve a transferência de assimilados diretamente do xilema para o grão e também a remobilização de assimilados de órgãos vegetativos, através do floema. O objetivo do presente trabalho foi estudar o padrão de nutrientes acumulados nas sementes de genótipos de arroz cultivados em duas regiões do Brasil e estudar o padrão e as correlações entre os nutrientes acumulados no grão. Além disso, foi verificada a ocorrência de transcritos homólogos a famílias gênicas de arroz (*Oryza sativa*) conhecidamente relacionadas com homeostase de ferro em bancos de ESTs de *Sorghum bicolor*, *Zea mays*, *Triticum aestivum* e *Saccharum officinalis* e em um banco contendo apenas ESTs de endosperma de milho (*Z. mays*). Estas análises permitiram prever quais famílias gênicas são funcionalmente expressas nestas espécies e especificamente durante a formação do grão de milho. Para as análises de acúmulo de nutrientes no grão foi utilizado o ICP-MS e os dados foram submetidos às análises estatísticas: ANOVA, correlação de Pearson e análise de trilha. Os resultados de correlação de Pearson dos nutrientes acumulados no grão não evidenciaram os efeitos diretos e indiretos dos nutrientes acumulados. Por outro lado a análise de trilha destes mesmos resultados demonstrou efeitos de correlação direta do Fe com P, S e Ca no experimento realizado em MG e correlação direta do Fe com P no experimento realizado no RS. Os dados de correlação entre teor de ferro acumulado nas folhas bandeiras de arroz e nas panículas nos diferentes estádios de desenvolvimento tiveram correlação positiva. Além disso, os teores de Fe acumulado no grão dos genótipos cultivados em MG foram superiores comparados aos cultivados no RS. Para verificar a ocorrência de homologia, as seqüências de aminoácidos referentes aos transcritos em arroz foram obtidas a partir do banco de dados NCBI e KOME. As seqüências de ESTs de banco de dados das espécies de gramíneas foram obtidas a partir do programa TIGR-*Plant transcripts assemblies* e do banco de endosperma de milho foi obtido do NCBI. Os genes foram alinhados utilizando o programa BLAST2 com a ferramenta TBLASTN

com e-value de $1e^{-10}$ e identidade mínima de 40%. Foram encontrados homólogos das famílias gênicas estudadas em todas as espécies avaliadas. A família gênica NAS, relacionada com a síntese de fitosideróforos, possui alta conservação (cerca 70%) entre os genes da família Poaceae estudada, com exceção do trigo e endosperma de milho. O gene OsFER1 apresentou alta conservação (cerca de 80%) entre todos os genes de Poaceae. Isto indica a importância dessas famílias gênicas no transporte e acúmulo de ferro entre as espécies de Poaceae. Foram encontradas representantes de cada uma das famílias IRT1, YSL e ZIP no endosperma de milho o que sugere que esses genes possam ser funcionalmente expressos durante a formação de grãos em milho.

ABSTRACT

MENDES, Giselle Camargo. M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, March, 2009.
Environmental and genotypic effects on nutrient content of rice seeds, *Oryza sativa*. Advisor: Andréa Miyasaka de Almeida. Co-advisors: Antônio Costa de Oliveira and Marco Antonio Oliva Cano.

Plants acquired strategies I and II for iron absorption. Strategy I occurs in terrestrial plants and includes the reduction of iron in the ferric form (Fe^{+3}) to ferrous form (Fe^{+2}). Strategy II of iron absorption is present in grasses and is characterized by the release of phytosiderophores to the environment that chelate ferric iron. The grain filling process in cereals involves the transfer of assimilates directly from the xylem to the grain and also remobilization of assimilates from vegetative organs through the phloem. The aim of this work was to study the pattern of accumulated nutrients in seeds of rice genotypes cultivated in two regions of Brazil and to study the pattern and correlations among the nutrients accumulated in the grain. Moreover, it was verified the occurrence of transcripts homologous to rice (*Oryza sativa*) gene families known to be related to iron homeostasis in ESTs databases of *Sorghum bicolor*, *Zea mays*, *Triticum aestivum* and *Saccharum officinalis* and in a database containing only maize (*Z. mays*) endosperm ESTs. These analyses pointed to gene families that are functionally expressed in these species and specifically during the formation of the maize grain. For the analysis of accumulation of nutrients in the grain it was used ICP-MS and the data were subjected to statistical analysis: ANOVA, Pearson correlation and path analysis. The Pearson correlation results of accumulated nutrients in the grain do not demonstrated the direct and indirect effects of nutrients accumulated. On the other hand, the path analysis of these same data revealed a direct correlation of Fe with P, S and Ca in the experiment conducted in MG and direct correlation of Fe with P in the experiment conducted in the RS. The data of correlation between iron content in flag leaves and panicle of rice in different stages of development showed positive correlation. Moreover, the levels of Fe accumulated in the grain of the genotypes grown in MG were higher compared to those grown in RS. To verify the occurrence of homology, the amino acid sequences related to the rice transcripts were obtained from NCBI and KOME databases. The sequences of ESTs from other grass species were obtained from TIGR-Plant transcripts assemblies program and the maize endosperm database was obtained from NCBI. The genes were aligned using the program BLAST2 with TBLASTN tool with e-value of $1e^{-10}$ and minimal identity of 40%. It was found counterparts of the gene families studied in all species evaluated. The NAS gene family, related to phytosiderophores synthesis showed high conservation (about 70%) among Poaceae family members studied, except wheat

and maize endosperm. The OsFER1 gene showed high conservation (80%) among all members of Poaceae. This suggests the importance of these gene families in the transport and accumulation of iron among the Poaceae species. It was found representatives from each one of the families IRT1, YSL and ZIP in maize endosperm which suggests that these genes may be functionally expressed during the formation of maize grain.

INTRODUÇÃO GERAL

1. Absorção de ferro pelas raízes

O ferro é um elemento abundante na crosta terrestre, porém a biodisponibilidade desse micronutriente essencial é baixa. O metal está predominantemente na forma de Fe^{+3} no ambiente sendo esta forma menos disponível para os vegetais. Devido a isso, as plantas desenvolveram estratégias de absorção do ferro (Hell & Stephan, 2003).

A estratégia I é a forma de aquisição de ferro pelas plantas terrestres com exceção das gramíneas e inclui a redução do ferro da forma férrica (Fe^{+3}) para a forma ferrosa (Fe^{+2}). Ocorre inicialmente uma extrusão de prótons para a rizosfera pelas proteínas transmembranas, presentes nas células epidérmicas das raízes, as H^{+} -ATPases. Em *Arabidopsis thaliana* foi encontrada a família gênica AHA (H^{+} -ATPases) responsável por essa acidificação do meio (Fox & Guerinot, 1998).

A acidificação aumenta a solubilidade do ferro na rizosfera e conseqüentemente ocorre redução do Fe^{+3} (íon férrico) oxidado para a forma solúvel Fe^{+2} (íon ferroso). Essa redução ocorre por meio de enzimas específicas, presentes na membrana de células epidérmicas presentes nas raízes, denominada oxidase redutase do ferro, codificada pelo gene *FRO2*. Esse gene foi caracterizado em *A. thaliana* e é induzido nas células epidérmicas radiculares por baixos níveis de ferro. A redução ocorre na presença de NADPH no citosol (Robinson *et al.*, 1999).

Após a redução, o íon é transportado para o interior das células radiculares por uma família protéica denominada IRT (Iron Regulated Transporter) localizadas na epiderme de células radiculares. Essa proteína foi caracterizada em *A thaliana* e têm alta afinidade pelo ferro na forma ferrosa (Eide *et al.*, 1996). Além disso, ela é capaz de mediar o transporte de outros minerais incluindo Mn, Zn, Co e Cd (Grotz & Guerinot, 2006).

De acordo com Henriques *et al.* (2002) a falta desse transportador IRT em *Arabidopsis* afeta profundamente o desenvolvimento vegetal, resultando em uma redução dos tilacóides nos cloroplastos, falta de parênquima paliçádico nas folhas e padrão irregular de células do córtex e da endoderme.

A estratégia II para absorção de ferro está presente em gramíneas. Em resposta à falta de ferro no ambiente, as gramíneas produzem aminoácidos não protéicos conhecidos como fitosiderósforos (FS) que serão exsudados para rizosfera solubilizando o mineral inorgânico Fe^{+3} formando um complexo Fe^{+3} -FS (Mori, 1999).

Os fitosideróforos compõem a família de ácidos mugineicos (MAs). A biossíntese deste ácido envolve o ciclo da metionina. Pela ação da nicotiamanina sintase (NAS) o S-adenosil metionina (SAM) produz a nicotianamina (NA). A nicotianamina aminotransferase (NAAT) transforma o NA em ácido deoximugineico (DMAs) o precursor de MAs (Nozoye *et al.*, 2007). Mori *et al.* (1991) identificaram que MAs estão presentes no xilema e floema de arroz e soja.

Sakaguchi *et al.* (1999) mostraram que MAs são secretados como ânions monovalentes, provavelmente via canais de ânions. Entretanto, o potássio presente nas células corticais radiculares sob deficiência de ferro era liberado algumas vezes com os MAs e quando era utilizado o inibidor de canais de potássio, o agente valiomeína, a excreção de MAs era reduzida, sugerindo que a secreção de MAs ocorre via simporte K^+/MA .

Aumento de FS ocorre sob deficiência de ferro. O complexo Fe-FS formado é então transportado por uma classe de proteína específica, codificada pelo gene *YSL* (*Yellow Stripe Like*) presentes na membrana plasmática de células epidérmicas radiculares. Esse gene é expresso tanto nas células epidérmicas das raízes como também na parte aérea. Isso sugere que este transportador não é responsável somente pela absorção de Fe do solo, mas também, pelo transporte intracelular deste íon para toda a planta (Grotz & Guerinot, 2006). Proteínas da família YSL estão presentes no floema e são responsáveis pelo transporte de minerais quelados com ácidos orgânicos denominados nicotianamina associados a Fe, Zn, Ni e Cu (Curie & Briat, 2003). O arroz apesar de ser gramínea apresenta tanto a estratégia II de absorção quanto a estratégia I de absorção de ferro (Ishimaru *et al.*, 2006).

2. Transporte de ferro na planta e compartimentalização

Após a absorção do ferro, o mesmo é direcionado para o xilema através de transportadores nas células corticais e conseqüentemente translocado para parte aérea via fluxo transpiratório (Curie & Briat, 2003). A translocação de ferro, através do xilema, envolve as células do parênquima do xilema. Esses transportadores fazem parte das seguintes famílias proteicas: NRAMP (*Natural Resistance Associated Macrophage Protein*) relacionada com o transporte de cátions divalentes; e Yellow Stripe Like (*YSL*) associada com o transporte de metais quelados (Grotz & Guerinot, 2006).

Uma vez que o metal entra na planta, o ferro é quelado para manter sua estabilidade e ser transportado para toda a planta. O Fe^{+3} ao chegar ao xilema é então

complexado com ácidos orgânicos como o citrato (Cataldo *et al.*,1988). Os complexos Fe^{+3} – citrato se movem pelo xilema e ao chegarem às folhas são reduzidos nas células do mesófilo foliar, pelas enzimas ferro redutase oxidase (FRO) com o auxílio de NADPH como poder redutor (Bruggemann *et al.*,1993).

A compartimentalização é uma etapa importante no metabolismo dos minerais. O mineral livre como o ferro, por exemplo, que estão nos vasos condutores e podem interagir com o peróxido de hidrogênio e formar radicais hidroxilas via reação de Fenton. Essa interação causa degradação de lipídios, proteínas e DNA (Eide *et al.*, 1996). Por isso, a importância que os minerais estejam armazenados em organelas e/ou proteínas específicas. A compartimentalização de ferro no vegetal é realizada no apoplasto, vacúolos, plastídeos e em proteínas presentes em órgãos específicos como a ferritina (Curie & Briat, 2003).

Recentemente foi identificada na membrana vacuolar a proteína presente no vacúolo de *A. thaliana*, denominada de VIT (vacuolar iron transport) que além de transportar o ferro, também transporta Mn para dentro do vacúolo (Kim *et al.*, 2006; Grotz & Guerinot, 2006). A remobilização do ferro, do vacúolo para o citoplasma, requer os transportadores AtNRAMP3 e AtNRAMP4 identificados em *A. thaliana*. Esses transportadores são considerados como essenciais na germinação e desenvolvimento de sementes sob deficiência de ferro no ambiente (Lanquar *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2006).

Nas organelas de compartimentalização, como mitocôndria e vacúolos, há a presença de ferritina. Essa proteína é responsável por armazenar cerca de 4500 átomos de ferro, sendo encontrada em tecidos específicos como sementes, raízes e parte aérea (Briat *et al.*,1999; Curie & Briat, 2003).

3. Genes Relacionados à Homeostase de Ferro em Plantas

ZIP (Zrt/IRT-like protein)

A família de proteínas *Zrt/IRT-like protein* (ZIP) possui oito genes em *A thaliana* (Curie & Briat, 2003). Um deles é o gene *IRT1* relacionado com a estratégia I de absorção de Fe^{+2} do solo. Além disso, o produto do gene *IRT1* também é responsável pela absorção de Mn^{+2} Zn^{+2} e Co^{+2} (Curie & Briat, 2003). Outro gene da família gênica ZIP é *IRT2*, um homólogo de *IRT1*, presente em células epidérmicas das raízes de *A. thaliana* responsável pelo transporte de Fe^{+2} e Zn^{+2} (Curie & Briat, 2003).

Em plantas de arroz, a família gênica *ZIP* é representada por 12 genes identificados por homologia com genes de *A. thaliana* (Gross *et al.*, 2003). De acordo com o trabalho de Ishimaru *et al.* (2006) foram identificadas a expressão dos genes *IRT1* e *IRT2* em células radiculares de plantas de arroz. Estudos com o promotor do gene *OsIRT1* fusionados ao gene da β -glucuronidase (GUS) constataram que esse gene era expresso, ainda, em células companheiras do floema. Conclui-se que o arroz possui as duas estratégias de absorção de Fe. Além disso, os autores identificaram que o gene *OsIRT1* é responsável pelo transporte de Fe a longa distância (Ishimaru *et al.*, 2006).

FRO (redutase oxidase do ferro)

A estratégia I de absorção de ferro no ambiente consiste na redução do Fe^{+3} para a forma solúvel Fe^{+2} . A enzima redutase oxidase do ferro (*FRO*), presente nas células epidérmicas radiculares, é responsável por essa redução (Yi & Guerinot, 1996).

A família *FRO* possui oito genes em *A. thaliana*. Essas proteínas estão amplamente expressas dentro do vegetal indicando a utilização deste mecanismo de redução em diversos tecidos (Feng *et al.*, 2006). Feng *et al.* (2006) identificaram que os genes *FRO* são expressos durante o crescimento e desenvolvimento da planta e que esses genes são regulados por fatores ambientais, como a luz. Nesse trabalho observou-se que o gene *AtFRO6* era expresso somente na parte aérea, sugerindo um possível envolvimento da luz como mecanismo regulatório (Feng *et al.*, 2006).

Os genes *OsFRO1* e *OsFRO2* foram identificados em plantas de arroz pelo estudo de homologias com os genes *FRO* caracterizados em *A. thaliana* (Gross *et al.*, 2003). De acordo com Ishimaru *et al.* (2006) o gene *OsFRO1* é expresso em folhas de plantas de arroz sob deficiência de Zn, Cu e Mn, enquanto o gene *OsFRO2* é expresso sob deficiência de ferro (Ishimaru *et al.* 2006). O trabalho apresentado por Ishimaru *et al.* (2006) mostrou que o gene *OsFRO2* não é expresso nas raízes de plantas de arroz. Isso está de acordo com a estratégia II de absorção de ferro em plantas de arroz, pois sob condições alagadas, verifica-se um baixo potencial redox do solo e isso favorece um aumento de Fe^{+2} .

YSL (yellow stripe like)

A família *Yellow Stripe Like* (YSL), com oito genes em *A. thaliana* foi identificada por análise *in silico* com similaridade com a família *Yellow Stripe* (YS) em milho (Gross *et al.*, 2003).

A estratégia II de absorção de ferro requer a presença de YSL1, em plantas de arroz, para a absorção do complexo Fe^{+3} -FS em células epidérmicas radiculares (Curie & Briat, 2003).

A família gênica *YSL* foi identificada com 18 genes supostos em arroz, a partir de estudo de homologies (Gross *et al.*, 2003). De acordo com o trabalho apresentado por Koike *et al.* (2004) os genes dessa família são expressos tanto em raízes quanto em folhas de plantas de arroz sob excesso e deficiência de ferro. De acordo com Koike *et al.* (2004), o produto do gene *OsYSL2* é responsável pelo transporte de Fe e Mn via floema e por sua translocação para o grão.

NRAMP (Proteína de macrófago associada à resistência natural)

A família *NRAMP* tem sete genes em *A. thaliana*. A expressão dos genes dessa família está amplamente distribuída em toda a planta estando envolvidos principalmente no transporte de cátions divalentes (Curie & Briat, 2003). O trabalho de Gross *et al.* (2003) mostrou a presença de oito genes de *NRAMP* em plantas de arroz através de estudo de homologia com os genes *NRAMP* de *A.thaliana*. De acordo com Narayanan *et al.* (2007) os genes *OsNRAMP2*, *OsNRAMP4* e *OsNRAMP7* são altamente expressos em folhas bandeiras e não-bandeiras de genótipos de arroz durante o estágio de enchimento do grão.

NAS (sintase da nicotianamina)

As gramíneas liberam classes de ácidos mugineicos para a rizosfera sob deficiência de ferro no ambiente a fim de aumentar a absorção desse metal (Inoue *et al.*, 2003). A família gênica *NAS* está envolvida na síntese de nicotianamina (NA) a partir da de S-adenosil metionina (SAM).

Em plantas de arroz foram identificados os genes *OsNAS1*, *OsNAS2* e *OsNAS3* (Higuchi *et al.*, 2001). Segundo esses autores a expressão de *OsNAS1* é induzida sob deficiência de ferro nas raízes e nas folhas e *OsNAS3* é expresso em folhas. As expressões desses genes nas folhas sugerem que a produção de NA são importantes para a homeostase de Fe nas plantas.

Inoue *et al.* (2003) através da atividade do promotor dos genes *OsNAS1* e *OsNAS2* fusionado a GUS mostraram que estes genes são expressos nas raízes e mais precisamente em células do protoxilema e metaxilema. Além disso, foi observada também alta expressão dos genes *OsNAS1* e *OsNAS2* em células companheiras. Em geral as expressões desses genes se localizam em células envolvidas no transporte a longas distâncias sugerindo o papel de NA em plantas gramíneas (Inoue *et al.*, 2003).

FER (Ferritina)

As ferritinas têm a função de armazenar o ferro. Essas proteínas são capazes de armazenar cerca de 4500 átomos de ferro na cavidade central de sua estrutura. Isso é extremamente importante para evitar que ocorra o estresse oxidativo sob excesso de ferro (Briat e Lobréaux, 1997). Estudos de homologia entre a família *FER* em milho e arroz identificaram a presença de *OsFER1* e *OsFER2* em plantas de arroz (Gross *et al.*, 2003).

4. Enchimento do grão

Após a absorção, através de transportadores nas células epidérmicas das raízes, os metais são direcionados através do simplasto para o xilema e translocados para parte aérea via fluxo transpiratório (Curie & Briat, 2003).

O processo de enchimento do grão em cereais envolve a transferência de assimilados diretamente do xilema para o grão e também a remobilização de assimilados de órgãos vegetativos, através do floema, contendo fonte de assimilados (Yang & Zhang, 2006).

Nos vasos do xilema os metais são quelados principalmente com o citrato favorecendo o transporte a longas distâncias (Kim & Guerinot, 2007). Ao chegarem às células do mesófilo foliar, os metais quelados são absorvidos por transportadores da família ZIP. Para alguns metais é requerida a redução nas células foliares e essa redução é realizada por enzimas FRO. Os metais após serem interiorizados são armazenados em organelas específicas (Kim & Guerinot, 2007).

Órgãos drenos, como as sementes, podem remobilizar nutrientes de órgãos fontes (Kim & Guerinot, 2007). Os assimilados, água e nutrientes são transportados via seiva floemática até chegarem às células do endosperma (Thorne, 1985). O pH do floema é em torno de 7,0 e com isso é necessário o processo de quelação dos metais, a

fim de tornarem esses metais mais solúveis (Kim & Guerinot, 2007). Diversos trabalhos têm demonstrado a importância de NA como agente quelador de metais principalmente no floema (Kim *et al.*, 2005). Já foi identificado o transporte de NA-Ni⁺² nos vasos do xilema e floema em *A. thaliana* (Kim *et al.*, 2005). O transporte do complexo nos vasos do floema Fe⁺²-NA (Didonato *et al.*, 2004), Cu⁺²-NA (Didonato *et al.*, 2004) e Mn⁺²-NA (Koike *et al.*, 2004) já foram identificados em plantas de arroz.

O gene *YSL1* está envolvido no transporte de Fe⁺²-NA no floema de *A. thaliana*. Em plantas de arroz, o gene *OsYSL2* é responsável por transportarem Fe⁺²-NA e Mn⁺²-NA (Kim & Guerinot, 2007).

Estudos têm indicado que o processo de enchimento do grão está ligado ao processo de senescência (Yang & Zhang, 2006). De acordo com Yang & Zhang (2006) o processo de enchimento de grão em plantas monocárpicas, como o arroz, envolve o processo de senescência da folha bandeira. Os tecidos senescentes são capazes de remobilizar o ferro para toda a planta.

A senescência promove a remobilização de assimilados das células antes que elas morram (Graaff *et al.*, 2006). O processo de remobilização de tecidos senescentes envolvem o catabolismo de proteínas, ácidos nucléicos e lipídeos (Graaff *et al.*, 2006).

A senescência em plantas de arroz é primeiramente percebida nas folhas bandeiras havendo uma remobilização de assimilados da folha para o grão (Bay & Choudhuri *et al.*, 1981). De acordo com esses autores, se os drenos forem removidos haverá atraso no processo de senescência. Resultados apresentados por Biswas & Choudhuri (1980) confirmam com os dados acima, em que a folha bandeira é metabolicamente ativa durante o processo de enchimento do grão.

Thorne (1985) sugere esquematicamente o processo de enchimento do grão de arroz (Figura 1). Os metabólitos provenientes da seiva floemática se conectam com as células companheiras através do simplasto. A figura 1 caracteriza o fluxo, através do simplasto, das células companheiras até às células da camada de aleurona.

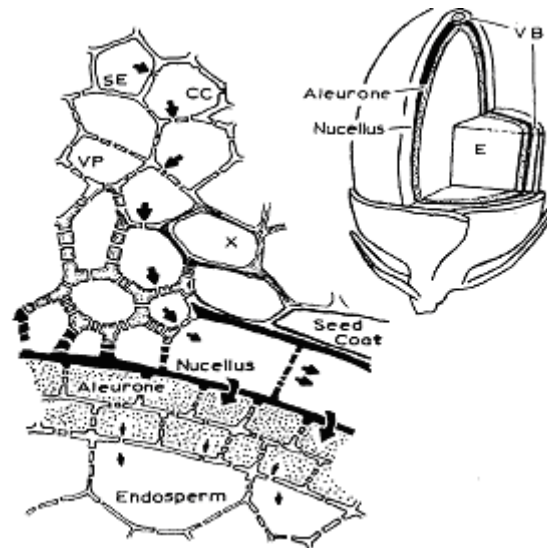


Figura 1. Esquema representativo do descarregamento de assimilados durante o desenvolvimento de sementes de arroz. SE: elemento de tubo crivado; CC: células companheiras; VP: parênquima vascular; X: xilema; N: nucelo; Aleurone: camada de aleurona; E: endosperma; VB: bainha do feixe (Thorne, 1985).

Narayanan *et al.* (2007) trabalhando com folhas bandeira e outras folhas durante o desenvolvimento médio do grão de quatro cultivares de arroz verificou a expressão de genes responsivos a transporte de metais no floema. Os genes *OsYSL5*, *OsYSL6*, *OsYSL7*, *OsYSL8*, *OsYSL18*, *OsNAS1*, *OsZIP1*, *OsZIP5*, *OsZIP8*, *OsNRAMP2*, *OsNRAMP4*, *OsNRAMP7* e *OsIRT1* tiveram alta expressão em ambas as folhas e em todos os cultivares. Esses genes estão relacionados com o transporte de minerais a longas distâncias e conseqüentemente atuam durante o fornecimento de minerais para as sementes no estágio de enchimento do grão.

Nas folhas das leguminosas há altas quantidade de ferritina e conseqüentemente no processo de remobilização o ferro é direcionado para o floema para ser armazenado em órgãos fontes, como sementes. O ferro é armazenado nas sementes sendo extremamente importante no processo de germinação (Briat *et al.*, 1999).

O enchimento do grão é um processo com ativo metabolismo de carboidrato objetivando a acumulação de amido. As principais enzimas que participam do processo de enchimento do grão são: ADP glicose pirofosforilase (AGP) e amido sintase (SS) (James *et al.*, 2003), catalizando a conversão da sacarose ao amido (James *et al.*, 2003; Yang & Zhang, 2006).

Durante a senescência há um aumento na proteólise das proteínas presentes nas folhas, principalmente da Rubisco. Essa proteólise faz remobilizar grande quantidade de aminoácidos que se movem através do floema para promover o enchimento do grão (Howarth *et al.*, 2008). Os aminoácidos livres se apresentam em alta concentração na

seiva do xilema e floema. Os aminoácidos presentes em maior quantidade nas folhas são aspartato e glutamato e durante o processo de senescência das folhas essa fonte de aminoácidos decresce predominando a glutamina (Howarth *et al.*, 2008).

Koike *et al.* (2004) caracterizam a importância do gene *OsYSL2* no transporte de minerais assimilados através do floema para os órgãos fontes. A proteína codificada pelo gene *OsYSL2* é responsável por transportar metais associados a agentes queladores através do floema a fim de facilitar o transporte dos minerais dentro da planta. Estudos indicam que Zn, Cu, Mn e Fe são transportados associados com nicotianamina (NA) no floema e xilema. A presença do gene *OsYSL2*, em grãos de arroz, sugere a importância desse gene no transporte de metais, no floema, para os órgãos fonte (Koike *et al.*, 2004).

Em sementes de muitas espécies existe uma comunicação intrínseca de células companheiras, parênquima vascular, endosperma e outras células modificadas de transferência (Thorne, 1985). Essa localização estratégica entre as células faz com que ocorra um rápido fluxo de solutos. Em sementes de arroz há extensa comunicação simplástica entre as células da seiva floemática até chegar ao endosperma (Thorne, 1985).

As sementes de arroz são formadas pela camada de aleurona e endosperma, como indicado na figura 1, bem como pericarpo e embrião. O trabalho de Ogawa *et al.* (1979) identificou minerais nas sementes maduras de arroz pela técnica de sonda micro eletro X-ray. Com base nesse trabalho caracterizou-se a presença de cálcio predominantemente localizado no pericarpo. A camada de aleurona é responsável por acumular Mg associados ao ácido fítico, fonte de P. O ácido fítico é a maior fonte de P com cerca de 70% desse mineral. O endosperma é a maior fonte de acumulação de K.

O trabalho de Laquar *et al.* (2005) identificou a importância dos genes *AtNRAMP3* e *AtNRAMP4* no estágio de germinação de sementes de *A.thaliana*. Esses transportadores têm a função de direcionar o ferro para o vacúolo principalmente em condições de falta de ferro no ambiente. O ferro no vacúolo está associado ao fitato. O fitato é um composto que está naturalmente presente em sementes de leguminosas e arroz no qual possui associação com minerais (Hallberg, 2001). Além disso, o ferro pode estar associado nas sementes por proteínas específicas denominadas ferritina sendo que nesta forma o mineral está mais disponível do que quando associado ao fitato (Hallberg, 2001).

O trabalho apresentado por Kim *et al.* (2006) identificou que o gene *VIT1* é expresso em sementes de *A.thaliana*. As sementes são fontes de amido e nutrientes e

esse gene se torna importante, já que é responsável por transportar o ferro para dentro do vacúolo. O gene *VIT1* é expresso no sistema vascular estando presente na camada de aleurona e no embrião em sementes de arroz (Kim *et al.*, 2006).

Referências Bibliográficas

- Bay S, Choudhuri M** (1981) Mobilization of metabolites from leaves to grains as the cause of monocarpic senescence in rice. *Plant Physiology*. 68:1345-1348.
- Biswas A K, Choudhuri M A** (1980) Mechanism of monocarpic senescence in rice. *Plant Physiology*. 65:340-345.
- Briat J F, Lobreaux S** (1997) Iron Transport and storage in plants. *Trends in Plant Science*. 2:187–193.
- Briat J F, Lobreaux S, Grignon N, Vanuyt G** (1999) Regulation of plant ferritin synthesis: how and why. *Cellular and Molecular Life Science*. 56:155–66.
- Bruggemann W, Maass-Kantel K, Moog P R** (1993) Iron uptake by leaf mesophyll cells: the role of the plasma membrane bound ferric-chelate reductase. *Planta*. 190:151–55.
- Cataldo D A, Mcfadden K M, Garland T R, Willdung R E** (1988) Organic constituents and complexation of nickel (II), iron (III), cadmium (II), and plutonium (IV) in soybean xylem exudates. *Plant Physiology*. 86:734–739.
- Curie C, Briat J F** (2003) Iron transport and signaling in plants. *Annual Review of Plant Biology*. 54: 183-206.
- Didonato R J, Roberts L A, Sanderson T, Easley R B, Walker E L** (2004) *Arabidopsis Yellow Stripe-Like2* (YSL2): a metal-regulated gene encoding a plasma membrane transporter of nicotianamine–metal complexes. *The Plant Journal*. 39:403-414.
- Eide D, Broderius M, Fett J P, Guerinot M L** (1996) A novel iron-regulated metal transporter from plants identified by functional expression in yeast. *Proceeding of the National Academy Science*. 93: 5624-5628.
- Feng H, An F, Zhang S, Ji Z, Ling H Q, Zuo J** (2006) Light-regulated, tissue-specific, and cell differentiation-specific expression of the *Arabidopsis* Fe(III)-chelate reductase gene *AtFRO6*. *Plant Physiology*. 140:1345-1354.
- Fox T M, Guerinot M L** (1998) Molecular Biology of cation transport in plants. *Annual Review Plant Physiology*. *Plant Molecular Biology*. 49:669-96.
- Graff E V D, Schwacke R, Scheneider A, Desimone M, Flugge U F, Kunze R** (2006) Transcription analysis of *Arabidopsis* membrane transporters and hormone pathways during development and induced leaf senescence. *Plant Physiology*. 141:776-792.

Gross J, Stein R J, Fett-Neto A G, Fett J P (2003) Iron homeostasis related genes in rice. *Genetics and Molecular Biology*. 26: 477-497.

Grotz N, Guerinot M L (2006) Molecular aspects of Cu, Fe and Zn homeostasis in plants. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1763:595-608.

Hallberg L (2001) Perspective on nutritional iron deficiency. *Annual Review of Nutrition*. 21: 4-21.

Hell R, Stephan U W (2003) Iron uptake, trafficking and homeostasis in plants. *Planta*. 216:541-551.

Henriques R, Jasik J, Klein M, Martinola E, Feller U, Schell J, Pais M S, Koncz C (2002). Knock out of *Arabidopsis* metal transporter gene *IRT1* results in iron deficiency accompanied by cell differentiation defects. *Plant Molecular Biology*. 50:587-97.

Higuchi K, Watanabe S, Takahashi M, Kawasaki S, Nakanishi H, Nishizawa N K, Mori S (2001) Nicotianamine synthase gene expression differs in barley and rice under Fe-deficient conditions. *The Plant Journal*. 25:159-167.

Howarth J R, Parmar S, Jones J, Shepherd C E, Corol D I, Gaister M, Hawkins N D, Miller S J, Baker J M, Verrier P J, Ward J L, Beale M H, Barraciough P B, Hawkesford M J (2008) Co-ordinated expression of amino acid metabolism in response to N and S deficiency during wheat grain filling. *Journal of Experimental Botany*. 13:3675-3689.

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 K (2006). Rice plants take up iron as an Fe³⁺-phytosiderophore and as Fe²⁺. *The Plant Journal*. 45: 335-346.

Inoue H, Higuchi K, Takahashi M, Nakanishi H, Mori S, Nishizawa N K (2003) 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*. 36:366-381.

James M G, Denyer K, Myers A M (2003) Starch synthesis in the cereal endosperm. *Current Opinion in Plant Biology*. 6:215-222.

Kim S, Takahashi M, Higuchi K, Tsunoda K, Nakanishi H, Yoshimura E, Mori S, Nishizawa N K (2005) Increased nicotianamine biosynthesis confers enhanced tolerance of high levels of metals, in particular nickel, to plants. *Plant and Cell Physiology*. 46:1809-1818.

Kim S A., Punshon T, Lanzirotti A, Li L, Alonso J M, Ecker J R, Kaplan J, Guerinot M L (2006) Localization of iron in *Arabidopsis* seed require the vacuolar membrane transporter VIT1. *Science*. 314:1295-1298.

Kim S A, Guerinot M L (2007) Mining iron: Iron uptake and transport in plants. *Federation of European Biochemical Societies Letters*. 581:2273–2280.

Koike S, Ionue H, Mizuno D, Takahashi M, Nakanishi H, Mori S, Nishizawa N K (2004) *OsYSL2* is a rice metal-nicotianamine transporter that is regulated by iron and expressed in the phloem. *The Plant Journal*. 39:415-424.

Lanquar V, Lelievre F, Bolte S, Hames C, Alcon C, Neumann D, Vansuyt G, Curie C, Schroeder A, Kraners U, Brygoo H B, Thomine S (2005) Mobilization of vacuolar iron by AtNRAMP3 and AtNRAMP4 is essential for seed germination on low iron. *European Molecular Biology Organization*. 24: 4041-4051.

Mori S, Nishizawa N K, Hayhi H, Chino M, Yoshimura E, Ishihara J (1991) Why are young rice plants highly susceptible to iron deficiency. *Plant and soil*. 130:143-56.

Mori S (1999) Iron acquisition by plants. *Current Opinion in Plant Biology*. 2: 250-253.

Naraynan N N, Vasconcelos M W, Grusak M A (2007) Expression profiling of *Oryza sativa* metal homeostasis genes in different rice cultivars using a cDNA macroarray. *Plant Physiology and Biochemistry*. 45: 277-286.

Nozoye T, Inoue H, Takahashi M, Ishimaru Y, Nakanishi H, Mori S, Nishizawa N K (2007) The expression of iron homeostasis-related genes during rice germination. *Plant Molecular Biology*. 64:35-47.

Ogawa M, Tanaka N., Kasai Z (1977) Note on the phytin-containing particles isolated from rice scutellum. *Cereal Chemistry*. 54:1029-1034.

Ogawa M, Tanaka K, Kasai Z (1979) Accumulation of phosphorus magnesium and potassium in developing rice grains followed by electron microprobe X ray analysis focusing on the aleurone layer. *Plant and Cell Physiology*. 20:19-27.

Robinson N J, Proctor C M, Connolly, M L, Guerinot (1999) A ferric chelate reductase for iron uptake from soils. *Nature*. 397:694-697.

Sakaguchi T, Nishizawa N K, Nakanishi H, Yoshimura E, Mori S (1999) The role of potassium in the secretion of mugineic acids family phytosiderophores from iron-deficient barley roots. *Plant and soil*. 215:221– 227

Thorne J H (1985) Phloem inloading of C and N assimilates in developing seeds. *Annual Review of Plant Physiology*. 36:317-343.

Yang J, Zhang J, Wang Z, Zhu Q, Liu L (2001) Water deficit-induced senescence and its relationship to the remobilization of pre-stored carbon in wheat during grain filling. *Agronomy Journal*. 93:196-206.

Yang J, Zhang J (2006) Grains filling of cereals under soil drying. *The New Phytologist*. 169:223-236.

Yi Y, Guerinot M L (1996) Genetic evidence that induction of root Fe(III) chelate reductase activity is necessary for iron uptake under iron deficiency. *The Plant Journal*. 10:835-844.

Waters B M, Grusak M A (2008) Whole-plant mineral partitioning throughout the life cycle in *Arabsdopsis thaliana* ecotypes Columbia, Landsberg erecta, Cape Verde Island, and the mutant line *ys/ysl/3*. *The New Phytologist*. 177:389-405.

CAPITULO 1

Acumulação e correlação de nutrientes em sementes de genótipos de *Oryza sativa* cultivados em Minas Gerais e no Rio Grande do Sul.

RESUMO

MENDES, Giselle Camargo, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2009. **Acumulação e correlação de nutrientes em sementes de genótipos de *Oryza sativa*, cultivados em Minas Gerais e no Rio Grande do Sul.** Orientadora: Andréa Miyasaka de Almeida. Co-orientadores: Antônio Costa de Oliveira e Marco Antonio Oliva Cano.

O cultivo de arroz em todo o mundo é realizado predominantemente sob a forma irrigada. Nessas condições de cultivo há a diminuição da difusão do oxigênio levando a hipoxia. Nesse caso, ocorre uma redução do Fe^{+3} precipitado como hidróxido e óxidos de ferro, para a forma mais solúvel Fe^{+2} . O processo de enchimento do grão em cereais envolve a transferência de assimilados diretamente do xilema para o grão e também a remobilização de assimilados de órgãos vegetativos do floema. O objetivo deste trabalho foi estudar o padrão de nutrientes acumulados e a correlação entre eles em sementes de genótipos de arroz cultivadas em duas regiões do Brasil. Os experimentos foram realizados em estações experimentais da EMBRAPA-Clima Temperado no Rio Grande do Sul (RS) e EPAMIG em Minas Gerais (MG), em duas áreas distintas em cada estação. Foram cultivados nove genótipos de *Oryza sativa* em cada área em três repetições. Dez sementes de cada repetição foram coletadas para fazer as análises da composição mineral por ICP-MS. Foram coletadas amostras de folha bandeira e panículas de plantas em diferentes estágios de desenvolvimento para análise do teor de ferro por espectrofotometria de absorção atômica. Os resultados mostraram que as quantidades totais de Fe no solo do experimento realizado em MG foram superiores (667,6 e 1339,8 mg kg^{-1}) ao experimento realizado no RS (236,1 e 152,7 mg kg^{-1}). O Fe acumulado no grão dos genótipos cultivados em MG foram superiores (5,63 a 11,73 mg kg^{-1}) ao do experimento realizado no RS (3,93 a 7,56 mg kg^{-1}). Os resultados mostraram diferenças estatisticamente significativas para o teor de minerais na semente dos genótipos avaliados quando cultivados nos diferentes ambientes com exceção dos micronutrientes Fe, Cu e Zn. Foram calculadas as correlações de Pearson em ambos os experimentos, porém essa metodologia não caracteriza os efeitos diretos e indiretos dos nutrientes acumulados. As análises de trilha mostraram correlação direta do Fe com o P, S e Ca no experimento realizado em MG e correlação direta do Fe com o P no experimento realizado no RS. Os teores de ferro acumulado em folhas bandeiras tiveram correlação positiva e significativa com os das panículas nos diferentes estágios de desenvolvimento do grão. Esses resultados indicam que altos teores de ferro nas sementes refletem em altos teores de P, e ainda, altos teores de ferro na folha bandeira se refletem em altos teores de ferro na panícula.

ABSTRACT

MENDES, Giselle Camargo, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, march de 2009. **Accumulation and correlation of nutrients in seeds of *Oryza sativa* genotypes cultivated in Minas Gerais and Rio Grande do Sul.** Advisor: Andréa Miyasaka de Almeida. Co-advisors: Antônio Costa de Oliveira and Marco Antonio Oliva Cano.

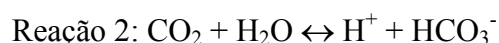
The rice cultivation in the world is predominantly in the irrigated form. Upon these cultivation conditions there is a reduction on oxygen diffusion leading to hypoxia. In this case, Fe^{+3} precipitated as hydroxide and iron oxides is reduced to Fe^{+2} , a more soluble form. The grain filling process in cereals involves the transfer of assimilates directly from the xylem to the grain and the remobilization of assimilates from vegetative organs through the phloem. The aim of this work was to study the pattern of nutrients accumulated and their correlation in seeds of rice genotypes grown in two regions of Brazil. The experiments were performed at experimental stations from EMBRAPA-Clima Temperado at Rio Grande do Sul State (RS) and EPAMIG at Minas Gerais State (MG), in two distinct areas in each station. Nine genotypes of *Oryza sativa* were cultivated in each area contained with three repetitions. Ten seeds from each repetition were collected for mineral composition analysis by ICP-MS. Flag leaf and panicle samples from plants in different developmental stages were collected for iron content analysis by atomic absorption spectrophotometry. The results showed that the total soil Fe content from the experiment conducted in MG was higher (667.6 and 1339.8 mg kg^{-1}) in relation to the experiment conducted in RS (236.1 and 152.7 mg kg^{-1}). The Fe accumulated in the grain of the genotypes grown in MG was higher (5.63 to 11.73 mg kg^{-1}) than the experiment conducted in the RS (3.93 to 7.56 mg kg^{-1}). The results showed statistically significant differences in the accumulation of minerals in the seed of the genotypes grown in different environments with the exception of the micronutrients Fe, Cu and Zn. Pearson's correlation were calculated in both experiments, but this method does not characterize the direct and indirect effects of nutrients accumulated. The path analysis showed a direct correlation of Fe with P, S, Ca in the experiment conducted in MG and direct correlation of Fe with P in the experiment conducted in the RS. Iron content in flag leaves had positive and significant correlation with iron content accumulated in panicles of rice in different stages of development. These results indicate that high levels of iron in the seed reflected in high levels of P, and that high levels of iron in the flag leaf is reflected in high levels of iron in the panicle.

Introdução

O cultivo de arroz em todo o mundo é predominantemente sob a forma irrigada (Guthrie, 1985). Nessas condições de cultivo há a diminuição da difusão do oxigênio atmosférico para o solo, devido ao fato de a água deslocar o ar entre os espaços porosos formando uma barreira na difusão dos gases. Essa condição de hipoxia leva a diminuição no potencial de óxido-redução do ambiente favorecendo o aumento de íons ferro em solução (Ponnanperuma *et al.*, 1972). Nesse caso, ocorre redução do Fe^{+3} precipitado como hidróxido e óxidos de ferro, para a forma mais solúvel Fe^{+2} . Conseqüentemente esse aumento de solubilidade aumenta a disponibilidade para as plantas no início do período de alagamento (Reação 1) (Ponnanperuma *et al.*, 1972).

Algumas horas após o alagamento, os organismos aeróbicos começam a morrer e os organismos anaeróbicos facultativos e obrigatórios começam a proliferar, tendo como substrato: nitrato, dióxido de manganês, óxidos e sulfatos (Ponnanperuma *et al.*, 1966). O consumo de oxigênio associado à respiração microbiana e liberação de CO_2 , havendo a formação de ácidos carbônicos causando diminuição de pH no meio (Reação 2) (Ponnanperuma *et al.*, 1972).

A concentração de Fe^{+2} em solução do solo aumenta até atingir um pico máximo dentro do primeiro mês após a inundação e em seguida ocorre um decréscimo gradual. Esse decréscimo é conseqüência da re-precipitação de óxidos e hidróxidos de Fe (Fageria, 1984; Ghosh *et al.*, 1975).



Os elementos principais que são afetados durante o alagamento em culturas de arroz são: N, P, S, Cu, Fe, Mn, Mo e Zn (Ponnamperuma, 1985). Propriedades do solo, duração da submersão e temperatura influenciam fortemente a concentração de Ca^{+2} , Mg^{+2} , SO_4^{-2} , bem como de K^+ na solução do solo (Greenland & Datta, 1985). De acordo com esses autores em solos alagados, como na cultura do arroz, há menor disponibilidade de Ca^{+2} e de SO_4^{-2} . A redução do enxofre pode implicar a imobilização de Zn^{+2} e Cu^{+2} . Além disso, o aumento de Mn^{+2} pode antagonizar a absorção de Zn^{+2} e sua translocação. A absorção de Zn^{+2} também pode ser afetada pela absorção de Ca^{+2} e Mg^{+2} .

Os minerais após serem absorvidos pelas raízes são translocados por toda a planta pelo fluxo transpiratório através dos vasos do xilema até as regiões de armazenamento. Cátions como Fe^{+2} , Zn^{+2} , Mn^{+2} e Cu^{+2} são transportados nos tecidos de toda a planta principalmente por transportadores das famílias gênicas *ZIP* (*Zinc Iron Transporter*), *NRAMP* (*Natural Resistance Associated Macrophage Protein*) e *YSL* (*Yellow Stripe Like*) (Curie & Briat, 2003). Após ser absorvido, o ferro é compartimentalizado em diversos órgãos. A compartimentalização de ferro na célula vegetal é realizada no apoplasto, vacúolos, mitocôndrias e plastídeos (Curie e Briat, 2003).

O processo de enchimento do grão em cereais envolve a transferência de assimilados diretamente do xilema para o grão e também a remobilização de assimilados de órgãos vegetativos, através do floema, contendo a fonte de assimilados (Yang & Zhang, 2006). Em arroz, a folha bandeira é a maior fonte de fotoassimilados e de nutrientes minerais que são remobilizados através do floema para as sementes (Grusak & DellaPenna, 1999). Durante o desenvolvimento do grão, a atividade de RNAses e proteases é alta em folhas bandeiras comparada com outras folhas. Isso se deve ao fato de que a folha bandeira está associada à panícula (Biswas & Choudhuri, 1980). A alta atividade de remobilização dos assimilados para o grão faz com que essas folhas entrem em senescência mais cedo do que as outras folhas (Biswas & Choudhuri, 1980).

As sementes de cereais contêm poucas proteínas, com cerca de 10% do seu peso seco comparadas às sementes de leguminosas. O embrião, a camada de aleurona, e o endosperma contêm proteínas chamadas de globulinas, glutelinas, prolaminas e albuminas, sendo estas proteínas diferenciadas pela solubilidade em água e solventes (Angel *et al.*, 2002). O predomínio de glutelinas está presente em maiores proporções em sementes de arroz, com cerca de 80% do peso seco da semente. Essas proteínas estão presentes em corpos protéicos no endosperma (Angel *et al.*, 2002). Essas estruturas armazenam grandes parte de proteínas, mas também é um depósito de minerais. Os minerais associados com as proteínas formam os chamados ácidos fíticos. Esses ácidos são compostos então por um sal de cátion de ácido mio-inositol-hexafosfórico. Os ácidos fíticos associados com metais são chamados de fitato. O Mg^{+2} e K^{+} são as formas mais comuns de cátions, mas também se encontram Ca^{+2} , Fe^{+2} , Mn^{+2} e Na^{+} (Lott & Spitzer, 1980). Muitos estudos de difração de raio-x têm caracterizado corpos protéicos em diversos tecidos de plantas e nas diferentes espécies. Em arroz, os depósitos de fitato estão em associação principalmente com Mg^{+2} e K^{+2} (Lott & Spitzer,

1980). O teor de ferro no endosperma das sementes de arroz é baixo (entre 7 e 24 mg kg⁻¹) (Graham *et al.*, 1999).

O objetivo deste trabalho foi estudar o padrão de nutrientes acumulados nas sementes de genótipos de arroz cultivados em duas regiões distintas e estudar o padrão e as correlações entre os nutrientes acumulados no grão.

Material e Métodos

Estações Experimentais

O experimento foi realizado na Estação Experimental Terras Baixas da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Clima Temperado (EMBRAPA-Clima Temperado), no município de Capão do Leão, Rio Grande do Sul, Brasil (altura 160m, latitude 31°37'Sul e longitude 52°21'Oeste) e na fazenda experimental da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG) em Leopoldina, Minas Gerais, Brasil (altura 210m, latitude 21°32' Sul e longitude 42°38' Oeste). Os experimentos foram realizados no ano agrícola de 2007/2008.

Os experimentos foram realizados em duas áreas distintas (área I e II) em cada localidade. Cada área era formada por três blocos, e em cada bloco foram cultivados nove genótipos de *Oryza sativa*. Dentro de cada bloco, os genótipos foram semeados em 3 linhas de 150 cm de comprimento, espaçadas de 30 cm entre si. O delineamento experimental utilizado foi em blocos ao acaso com três repetições.

Os genótipos utilizados no experimento foram escolhidos com base em níveis contrastantes de ferro acumulado no grão, identificados por um experimento realizado em 2006 e também em relação à genealogia deles (tabela 1). Os genótipos utilizados foram: BR-IRGA 409, BR-IRGA 410, IRGA 417, BRS ATALANTA e BRSMG Predileta, e as linhagens BRA 041255, BRA 041176, BRA 041152 e BRA 041171. O genótipo BRSMG Predileta e o EPAGRI 107 foram introduzidos no campo como uma testemunha sensível e tolerante ao ferro, respectivamente.

Tabela 1. Teor de ferro em sementes e genealogia de genótipos de arroz cultivados no ano agrícola 2005-2006.

Genótipo	Origem	Genealogia	Teor de ferro nas sementes (mg g ⁻¹) ¹
BR IRGA 409	EMBRAPA Clima Temperado	IR 930-2/IR 665-31-2-4	8,34
IRGA 417	EPAGRI e EMBRAPA Clima Temperado	New Rex/IR19743-25-2-2 x BR-IRGA 409	18,42
BR IRGA 410	EMBRAPA Clima Temperado	IR 930-53/ IR 665-3-1-2-4	8,26
BRS ATALANTA	EMBRAPA Clima Temperado	Têm na genealogia a Br-IRGA 410	11,64
BRA 041176	EPAMIG	CNA IRAT 4/4/0-15-B-2-B-9-B-B	8,75
BRA 041255	EPAMIG	CNA IRAT 4/4/0-231-B-8-B-1-B-B	13,39
BRA 041171	EPAMIG	CNA IRAT 4/4/0-258-B-6-B-12-B-B	12,19
BRA 041152	EPAMIG	CNA IRAT 4/4/0-60-4-B-B-5-B	9,97

¹Quantificação realizada por ICP-MS

Determinação do teor de ferro em sementes de arroz pela técnica de espectrometria de massas com fonte de plasma indutivamente acoplado (ICP-MS)

Em cada parcela de cada área foram coletadas 10 sementes de cada genótipo. As sementes foram descascadas manualmente e enviadas para o Departamento de Horticultura na Universidade de Purdue - EUA.

A análise da composição mineral foi realizada utilizando a técnica de espectrometria de massas com fonte de plasma indutivamente acoplado (ICP-MS), de acordo com Lahner *et al.*, (2003). Para a preparação do extrato a ser analisado, foram utilizadas 10 sementes de arroz de cada cultivar/linhagem de cada parcela, secas durante toda a noite e pesadas antes da digestão. A digestão com 1,5 mL de HNO₃ (*Fisher Trace Metal grade*) concentrado, à 118°C por 4 horas e em seguida diluídas em 16 mL de água analisado por *Thermo Elemental PQ Excell* ICP-MS. As amostras foram diluídas e corridas duas vezes no ICP-MS, para mensurar os 12 elementos de interesse. O teor dos seguintes minerais (em mg kg⁻¹) foram determinados: macronutrientes: magnésio (Mg), fósforo (P), enxofre (S), potássio (K), cálcio (Ca), e micronutrientes: manganês (Mn), ferro (Fe), níquel (Ni), cobre (Cu), zinco (Zn) e os minerais: arsênio (As) e rubídio (Rb).

Análise do teor de ferro nos tecidos

Os materiais coletados para a análise do teor de ferro foram: folhas bandeiras e panículas no estágio leitoso, pastoso e final de desenvolvimento. Segundo Conce *et al.*, (2000) o estágio leitoso, pastoso e final de desenvolvimento da planta correspondem aos estádios R6, R7 e R8 respectivamente.

Para a determinação de ferro na parte aérea o material vegetal fresco foi colocado em estufa para a secagem a 75°C até atingir peso constante. Em seguida o material foi moído no moinho Willey e levados ao laboratório de análises de solos da Universidade Federal de Viçosa, onde foram digeridos em 10 mL de solução nítrico-perclórica (3:1) e o ferro no extrato mineral foi determinado por espectrofotometria de absorção atômica (Kampfenkel *et al.*, 1995).

Análise de solos

Os solos dos experimentos realizados em Minas Gerais e no Rio Grande do Sul foram coletados entre 0-20 cm de profundidade por um trado, as amostras foram coletadas e secas ao ar. Em cada parcela, de cada área experimental, procedeu-se a coleta por caminhamento em zigue-zague de cinco pontos. Após a coleta dos cinco pontos de cada parcela foram feitas amostras compostas das coletas de todas as parcelas, totalizando 15 coletas. Em seguida, os solos foram enviados para o laboratório de análise de solo Viçosa Ltda., localizado em Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

Para quantificação dos minerais P, K, Fe e Mn foi utilizado o extrator de Mehlich 1. Para a determinação do pH foram utilizados KCl e CaCl₂ (1:2,5). Para a determinação de Ca, Mg e Al foi utilizado o extrator KCl (1mol L⁻¹). Para H+Al, foi utilizado extrator acetato de cálcio (0,5 mols L⁻¹ pH 7,0). A quantidade de matéria orgânica (MO) foi determinada pela concentração orgânica x 1,724 (Walkley - black). Foram ainda determinados soma de bases trocáveis (SB), capacidade de troca catiônica efetiva (CTC t), capacidade de troca catiônica a pH 7,0 (CTC T), índice de saturação das bases (V), índice de saturação do alumínio (m) e fósforo remanescente (P-rem).

Extração de RNA, síntese de cDNA e RT-PCR em tempo real (qRT-PCR)

O RNA total foi extraído utilizando o reagente Trizol (Invitrogen) seguindo as recomendações do fabricante com modificações. Na fase de precipitação do RNA, após o sobrenadante contendo o RNA ser transferido para outro tubo autoclavado, foi adicionado 250µL de isopropanol, 125µL de citrato de sódio (0,8M) e 125 µL cloreto de sódio (1,2M). Em seguida, na fase de lavagem do RNA foi adicionado ao pellet 1mL de álcool 70%.

RNA total foi extraído de folhas bandeiras dos genótipos BRIRGA 410 e IRGA 417 na área I e II do experimento realizado no Rio Grande do Sul. Para o experimento

de qRT-PCR foram utilizadas três repetições biológicas, cada repetição foi proveniente dos blocos pertencentes a cada área experimental, do experimento realizado na EMBRAPA-Clima temperado. Além disso, foram utilizadas três replicadas técnicas. Após a extração o RNA foi quantificado e analisado pelo gel de agarose 0,8% (p/v), corado com brometo de etídio.

A síntese de cDNA foi realizada com 2µg de RNA total, pré-tratado com 1µl de DNase (50U/µL, Invitrogen), incubada por 37°C a 15 min; para retirar os possíveis contaminantes de DNA genômico e para tal foi utilizado o protocolo da Invitrogen seguindo as normas do fabricante.

O experimento de PCR em tempo real foi conduzido em aparelho 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystem). Foi utilizado o mix SYBR Green PCR master (Applied Biosystem). As condições de amplificação foram: 95°C por 10 min, e 40 ciclos a 95°C por 30 segundos e 60°C por 1 min. Para a quantificação da expressão gênica foram utilizados os métodos comparativos de Ct: $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Como controle para a normalização dos dados do qRT-PCR foi utilizado o primer específico 18S.

Tabela 2. Os oligonucleotídeos utilizados no experimento de qRT-PCR.

Primers	Sequência (5' – 3')		Tamanho Amplicon (pb)	acesso NCBI
18S	GGGTTATTTTCCTTTACGGCAAT	Foward	70	AK059783
	AATACACTCCATCGATCAAAAATACA	Reverse		
OsNRAMP 2	TGCAAGGTAAACTGCCAATACAA	Foward	50	AK065481
	GGAGCATTGGTTCGGTCAAG	Reverse		

Os oligonucleotídeos foram desenhados utilizando o programa Primer Express 3.0 (Applied Biosystem).

Análises estatísticas

Os dados de teor de nutrientes no grão foram submetidos à análise de variância (ANOVA) conjunta para todos os ambientes, para cada um dos caracteres, com a finalidade de obter os efeitos simples e das interações e submetidos ao teste de comparação de medias, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Foram feitas análises de correlações de Pearson, no qual foram identificadas as correlações do mineral ferro e todos os outros minerais. Foram feitas análise de trilha (Wright, 1921 e 1923) que consiste no estudo dos efeitos diretos e indiretos de caracteres independentes explicativos sobre uma variável dependente principal básica, cujas estimativas são obtidas por meio de equações de regressão, em que as variáveis

são prementes padronizadas (Cruz *et al.*, 2004). A padronização faz com que a média seja igual a zero e a variância igual a um; a covariância entre duas variáveis é igual a correlação entre essas variáveis. Essas análises permitiram decompor as correlações em efeitos diretos e indiretos do mineral ferro (variável básica) com os demais nutrientes (variáveis explicativas) (Cruz *et al.*, 2004).

Para as análises ANOVA, teste de médias, correlação de Pearson e análise de trilha foi utilizado o programa GENES (Cruz, 2006).

Resultados

Análise dos solos dos locais de cultivo em Minas Gerais e Rio Grande do Sul

Nos solos de Minas Gerais há maior quantidade de ferro nas áreas I e II (667,5 e 1339,8 mg kg⁻¹) respectivamente, comparado aos solos das áreas do experimento realizado no Rio Grande do Sul (236,1 e 152,7 mg kg⁻¹) como mostrado na tabela 3. O extrator de Mehlich-1 utilizado para a extração do ferro permite a quantificação do ferro total. Tanto formas indisponíveis de ferro como hidróxidos e óxidos de ferro e formas disponíveis de ferro presentes no solo são extraídas (Oliveira & Nascimento, 2006).

Nos solos do estado de MG verifica-se maior quantidade de matéria orgânica (1,1 e 1,5 dag Kg⁻¹) comparado ao experimento do RS (1,0 e 0,6 dag Kg⁻¹). A matéria orgânica tem influência grande nas reações redox em solos inundados (Ponnamperuma *et al.*, 1972). O alto teor de matéria orgânica (MO) favorece o processo de redução dos compostos sólidos do solo, isso favorece um aumento na disponibilidade de nutrientes na solução do solo (Ponnamperuma *et al.*, 1972).

Os solos das áreas dos experimentos de MG possuem maior quantidade de P (6,6 e 8,8 mg dm⁻³). Em solos de várzeas normalmente se verifica predomínio de fosfatos ligados ao ferro (Goedert *et al.*, 1971). Diante disso, o alto teor de ferro no experimento realizado em MG pode ainda caracterizar alto teor de fósforo nesse ambiente comparado ao experimento realizado no RS.

Os solos oriundos das áreas do experimento realizado no RS possuem maiores valores de soma das bases trocáveis (SB) (3,59 e 5,43 cmol_c dm⁻³), CTC (8,38 e 9,72 cmol_c dm⁻³) comparado ao estado de MG. Os valores de H+Al são maiores (4,29 e 4,79 cmol_c dm⁻³) em MG comparados ao experimento realizado no RS (3,69 e 4,29 cmol_c dm⁻³).

Tabela 3. Análise de solos dos locais de cultivo em Minas Gerais e do Rio Grande do Sul.

Solo	pH	P	K	Ca ⁺²	Mg ⁺²	Al ⁺³	H+Al		
		mg dm ⁻³	mg dm ⁻³	cmol _c dm ⁻³	cmol _c dm ⁻³	cmol _c dm ⁻³	cmol _c dm ⁻³	cmol _c dm ⁻³	
Área I Minas Gerais	5,7	6,6	44	1,2	0,6	0	3,63		
Área II Minas Gerais	5,7	8,8	37	1,2	0,6	0	4,29		
Área I Rio Grande do Sul	5,6	2,4	34	2	1,5	1	4,79		
Área II Rio Grande do Sul	5,9	1,8	50	2,7	2,6	1	4,29		

Solo	SB	CTC	CTC	V	M	MO	P-rem	Fe	Mn
	cmol _c dm ³	cmol _c dm ³	cmol _c dm ³	%	%	dagkg ⁻¹	mgL ⁻¹	mg dm ³	mg dm ³
Área I Minas Gerais	1,91	1,9	5,54	34	0	1,1	25,5	667,6	59,7
Área II Minas Gerais	1,89	1,89	6,18	31	0	1,5	24,1	1339,8	58,4
Área I Rio Grande do Sul	3,59	4,59	8,38	43	22	1	32,7	236,1	32,6
Área II Rio Grande do Sul	5,43	6,43	9,72	56	16	0,6	17	152,7	29,8

SB = Soma das bases trocáveis; CTC(t) = Capacidade de troca catiônica efetiva; CTC (T) = Capacidade de troca catiônica a pH7,0; V=Índices de saturação de bases; m=Índice de saturação de alumínio; MO = Matéria orgânica; P-rem = Fósforo remanescente

Potencial genético e variabilidade dos cultivares de arroz em diferentes ambientes

Os dados de teor de nutrientes nas sementes nas duas localidades de cultivo dos genótipos de arroz foram submetidos à ANOVA conjunta. Esse procedimento permitiu verificar o desempenho dos genótipos (G), do ambiente (A) e a interação entre eles (G X A), em relação aos nutrientes acumulados.

Com base nos dados da ANOVA conjunta (Tabela 4) detectaram-se diferenças significativas a 5% de probabilidade pelo teste F, para os fatores genótipo (G), ambiente (A) e para a interação entre ambos (G X A), para a maioria dos caracteres, com exceção do Fe, Cu, Zn. Para o Fe e Zn não se detectaram diferenças significativas a 5% de probabilidade pelo teste F, para Genótipo e a interação G X A. Para o Cu, não se detectou diferenças significativas a 5% de probabilidade pelo teste F, para a interação G X A. Os resultados das análises de variância referente a cada ambiente separadamente estão apresentados nas Tabelas A1 a A4 (anexos). Os diferentes genótipos de arroz se comportam da mesma forma, para a acumulação desses micronutrientes nas sementes, nos diferentes ambientes estudados (Tabela 4). O fator genético não foi considerado relevante para esses minerais. Porém, para os outros nutrientes, o efeito da interação foi significativo.

O coeficiente de variação (CV) revelou valores entre intermediária e alta magnitude, variando de 8,2% para o mineral S, e 42,8% para o As (Tabela 4). Esse

grande valor do CV em As, se atribui a sensibilidade do ICP-MS, no qual as análises são processadas em partes por bilhão (ppb), além disso os pequenos valores deste mineral nas sementes podem ser a fonte de variação entre as repetições.

Tabela 4. Resumo da ANOVA para os variáveis teores de: magnésio (Mg), fósforo (P), enxofre (S), potássio (K), cálcio (Ca), manganês (Mn), ferro (Fe), níquel (Ni), cobre (Cu), zinco (Zn), arsênio (As), rubídio (Rb), em sementes de nove genótipos de arroz, submetidos aos quatro ambientes diferentes (RS e MG – áreas I e II).

FV	GL	Quadrado Médio calculados com base no teor de minerais (mgkg ⁻¹)											
		Mg	P	S	K	Ca	Mn	Fe	Ni	Cu	Zn	As	Rb
Genótipo	8	76115,95*	327222,39*	77267,7*	134669,35*	2614,37*	55,97*	7,74 ^{ns}	0,04*	2,1*	162,23 ^{ns}	0,02*	8357,53*
Ambiente	3	740041,04*	7303524,14*	1217503*	1783821,1*	22287,7*	392,8*	115,6*	0,66*	80,7*	270,17*	0,18*	167585,3*
G X A	24	23045,35*	271455,12*	18593*	138176*	637,4*	13,75*	2,64 ^{ns}	0,03*	1,33 ^{ns}	133,12 ^{ns}	0,01*	2518,84*
Residuo	64	11493,81	108831	6987	39545,5	381,18	7,92	2	0,005	0,95	97,95	0,0071	1241,92
CV (%)		9,34	11,4	8,2	9,93	17,7	14,71	19,74	26,18	38	37,28	42,8	15,5

*Significativo a 5% de probabilidade para o teste F

^{ns} não significativo

Para o teste de comparações das médias entre os genótipos, nos quatro ambientes diferentes verificou que houve diferença significativa a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey, entre os genótipos (Tabelas 5 a 8). Isto evidencia a presença de dissimilaridade entre os genótipos utilizados no experimento.

De acordo com os dados das tabelas, os maiores teores de nutrientes acumulados nas sementes, pertencem à classe dos macronutrientes Mg, P, S, K e Ca (1474; 3623,33; 1384,33; 2363 e 178,33 mg g⁻¹) respectivamente. Entretanto, se verificou o conteúdo dos macronutrientes, o mineral Ca, é o que possui os menores teores de acumulação nas sementes (178,33 mg g⁻¹).

No experimento do RS, área I (Tabela 5), a maior variabilidade entre os genótipos, foi observada para o mineral K. Não se verificaram diferenças estatísticas entre os genótipos em relação às variáveis Fe, Zn e Rb. O genótipo que apresentou as maiores médias, ou seja, os maiores teores de acumulação de nutrientes foi o BRSMG Predileta seguido pelo BR-IRGA 409.

No experimento do RS, área II (Tabela 6) a maior variabilidade entre os genótipos foi observada para o mineral Ca. Não se verificaram diferenças estatísticas entre os genótipos em relação aos nutrientes Mn, Fe, Ni, Cu, As e Rb. O genótipo que apresentou as maiores médias, ou seja, os maiores teores de nutrientes acumulados também foi o BR-IRGA 409 e, em seguida, BRSMG Predileta.

Comparando os dois ambientes acima, de forma geral, houve aumento nos teores de alguns nutrientes minerais, na área II em relação à área I, como o Mg, P, K, Ni, e Rb, porém, houve diminuição na acumulação dos nutrientes Ca, Mn, Cu nas sementes. Na área II, observou-se aumento de variabilidade genética, aumentando o número de classes.

No experimento realizado em MG, área I (Tabela 7) verificou-se que não houve diferença estatística entre os genótipos em relação aos elementos Mg, P, K, Ca, Ni, Cu, Zn, As e Rb. Entretanto, houve diferença entre os genótipos, com base nos nutrientes S, Mn e Fe. O genótipo que apresentou as maiores médias, ou seja, os valores mais altos da maioria dos nutrientes foi o IRGA 417 seguido do BRS Atalanta.

No experimento realizado em MG, área II (Tabela 8), a variável que apresentou maior variabilidade entre os genótipos foi o Ni. Não se verificaram diferenças estatísticas entre os genótipos em relação às variáveis Mg, P, K, Ca, Fe Zn e As. Entretanto, houveram diferenças significativas entre os genótipos, com base nos minerais S, Mn, Ni, Cu e Rb. O genótipo que apresentou as maiores médias, ou seja, os valores mais altos da maioria dos nutrientes foi o IRGA 417. Comparando os dois

ambientes em Minas Gerais, de forma geral, na área I, se verificaram os maiores teores de acumulação de nutrientes, entre os genótipos, com destaque para Mg, P, K, Fe e Rb.

Os genótipos utilizados nesse trabalho foram agrupados, pelo método de variáveis canônicas, com base nos 12 nutrientes acumulados no grão. Os resultados das análises desses agrupamentos estão visualizados na tabela A5 e figura A1 (anexos). Os dados foram agrupados, ainda, com o método de Tocher e UPGMA a fim de diferenciar os agrupamentos formados em cada metodologia empregada. Os resultados destes agrupamentos são mostrados nas tabelas A6 e figuras A2 a A5 (anexos).

Tabela 5. Teores de magnésio (Mg), fósforo (P), enxofre (S), potássio (K), cálcio (Ca), manganês (Mn), ferro (Fe), cobalto (Co), níquel (Ni), cobre (Cu), zinco (Zn), arsênio (As) e rubídio (Rb), em mg kg⁻¹, em sementes de nove cultivares de *Oryza sativa* na área I RS.

Genótipos	Mg	P	S	K	Ca	Mn	Fe	Ni	Cu	Zn	As	Rb
1-BR IRGA 409	1145 Ba	2656,67 Ba	1268,33 Aab	1794 Bab	123,67 Ab	33,70 Aa	6,33 ABa	0,5 Abc	6,53Aab	26,73Aa	0,15 Ab	127,33 Ba
2-BR IRGA 410	886,33 Bab	1937,67 Bab	1287,33 Aa	1472 Bbc	116,67 Ab	22,86 Ab	4,67 Ba	0,21 Bc	4,93Aab	22,9 Aa	0,31 Ab	124,66 Ca
3-IRGA 417	838,67 Bb	1949,67 Bab	1205,67 Aab	1456,33 Cbc	120,33 Ab	24,94 Ab	6,7 Ca	0,21 Bc	4,1 Aab	21,7 Aa	0,2 Ab	109,33Ba
4-BRS Atalanta	852,33 Bb	1956 Bab	1254,67 Aab	1697,33Aabc	146,33 Aab	20,1 Ab	4 Ca	0,24 ABc	4,6 Aab	32,73Aa	0,28 Ab	116 Ba
5-BRA 041255	935 Bab	2352 Bab	1341,67 Aa	1746,33Babc	145 Aab	24,03 Ab	5,3 BCa	0,55 Aa	6,46 Aa	33,46Aa	0,22 Ab	128,33Ba
6-BRA 041176	849,33 Bb	2085,33 Bab	1052 Abc	1600,33 Cbc	177,67 Aa	25,63 Ab	5,13 Ba	0,34ABbc	5 Aab	35,3 Aa	0,2 Ab	121,33 Ca
7-BRA 041152	787,33 Bb	1917,33 Bab	1283,67 Aa	1541,33Bbc	139 Aab	21,86 Ab	4,9 Ca	0,52Aab	5,96 Aa	31,4 Aa	0,16 Ab	108,66 Ca
8-BRA 041171	664,33 Bb	1539 Cb	971 Bc	1263,33Cc	132,67 Aab	20,43 Ab	3,93Ca	0,44Aab	5,5 Ab	29,73Aa	0,24 Ab	97 Ca
9-BRSMG												
Predileta	1149 Aa	2691,33 Aa	1387,33 Aa	2128,67Aa	178,33 Aa	23,16 Ab	5,9 ABa	0,22Bc	5,63Aab	37,36ABa	0,66 Aa	146,33 Ca

Letras maiúsculas diferentes na vertical indicam diferenças significativas entre as médias dos genótipos nos quatro ambientes (RS áreas I e II tabelas 5 e 6 e MG áreas I e II tabelas 7 e 8) pelo teste de Tukey a 5%. Letras minúsculas diferentes na vertical denotam diferenças significativas, pelo teste de Tukey a 5%, entre médias dos genótipos dentro da mesma área.

Tabela 6. Teores de magnésio (Mg), fósforo (P), enxofre (S), potássio (K), cálcio (Ca), manganês (Mn), ferro (Fe), cobalto (Co), níquel (Ni), cobre (Cu), zinco (Zn), arsênio (As) e rubídio (Rb), em mg kg⁻¹, em sementes de nove cultivares de *Oryza sativa* na área II RS.

Genótipos	Mg	P	S	K	Ca	Mn	Fe	Ni	Cu	Zn	As	Rb
1-BR IRGA 409	1474 Aa	3623,33 Aa	1256,67Aa	2296,67 Aab	100,33ABcd	16,63Ba	5,56 Ba	0,43 Aa	2,53 Ba	19,3Aab	0,13Aa	231,66Aa
2-BR IRGA 410	1165,67 Ab	2598,67 ABb	1132 Aab	1575,67 Bc	90,33 Ad	14,6Ba	4,9Ba	0,37Aa	1,96BCa	15,86Ab	0,16ABa	191BCa
3-IRGA 417	1238,33 Aab	3032,33 Aab	1088,67ABab	1879,33BCabc	119 Abcd	16,4Ba	7,56Ba	0,4 Aa	2,13ABa	18,66Aab	0,18 Aa	246Aa
4-BRS Atalanta	1088,33 Ab	2636 ABb	1224 Aa	1854,67 Aabc	127,67Aabcd	13,9Ba	6,13BCa	0,3 Aa	2,07 Ba	26,67Aab	0,25 Aa	172,33ABa
5-BRA 041255	1241 Aab	3260,67 Aab	1147,33 Bab	2260 Aab	148,33 Aabc	13,83Ba	5,8BCa	0,54 Aa	2,8Ba	39,6 Aab	0,22 Aa	263,33Aa
6-BRA 041176	1219,33 Aab	3360,33 Aab	996 Ab	2363 Aa	173,33 Aa	14,73Ba	4,33Ca	0,4Aa	3.1 ABa	21Aab	0,16 Aa	223.66Ba
7-BRA 041152	1210,33 Aab	3133,67 Aab	1237,33 Aa	2059,67 Aabc	124,33ABabcd	15Ba	5,96Ba	0,5Aa	2,4 Ba	22,6 Aab	0,17 Aa	226,66Ba
8-BRA 041171	1149,33 Ab	2837 Bab	1178,33 Aab	1780,33 Bbc	104AB bcd	14,6 Aa	6,0BCa	0,46 Aa	2,43ABa	27,13Aab	0,21 Aa	180Ba
9-BRSMG												
Predileta	1179,33 Ab	3056,33 Aab	1282,33 Aa	2109 Cab	153 Aab	13,3 Ca	4,46Ba	0,4 Aa	2,2 Ba	44,2 Aa	0,2 ABa	259,33 AB

Letras maiúsculas diferentes na vertical indicam diferenças significativas entre as médias dos genótipos nos quatro ambientes (RS áreas I e II tabelas 5 e 6 e MG áreas I e II tabelas 7 e 8) pelo teste de Tukey a 5%. Letras minúsculas diferentes na vertical denotam diferenças significativas, pelo teste de Tukey a 5%, entre médias dos genótipos dentro da mesma área.

Tabela 7. Teores de magnésio (Mg), fósforo (P), enxofre (S), potássio (K), cálcio (Ca), manganês (Mn), ferro (Fe), cobalto (Co), níquel (Ni), cobre (Cu), zinco (Zn), arsênio (As) e rubídio (Rb), em mg kg⁻¹, em sementes de nove cultivares de *Oryza sativa* na área I MG.

Genótipos	Mg	P	S	K	Ca	Mn	Fe	Ni	Cu	Zn	As	Rb
1-BR IRGA 409	1379 Aa	3415,33 Aa	882,33Bab	2250,67 Aa	87,33 ABA	21,5Bab	8,67 Aab	0,12Ba	0,87 Ba	25,83Aa	0,11Aa	300 Aa
2-BR IRGA410	1297,67 Aa	3187 Aa	934,33Ba	2100,33 Aa	79,33 Aa	18,27ABab	10 Aa	0,12BCa	0,7 Ca	21,5A a	0,08Ba	279,66Aab
3-IRGA 417	1336 Aa	3552,33 Aa	952,33BCa	2355,33 Aa	100,33Aa	24,36Aa	11,73 Aa	0,16 Ba	0,93 Ba	26,36Aa	0,09 Aa	314 Aa
4-BRS Atalanta	1270,33Aa	3249,67Aa	843,33Bab	2090,33Aa	85 Ba	16,1ABb	9,56 Aa	0,12Ba	0,76Ba	21,83Aa	0,11 Ba	194,66 Ab
5-BRA 041255	1223,33 Aa	3126 Aa	823 Cab	2178,33 Aa	81,67Ba	15,5B ab	8,63 ABab	0,10Ba	0,6 Ba	24 Aa	0,09Aa	333,33 Aa
6-BRA 041176	1180,67 Aa	2954 Aa	693,67Bb	2054,33 ABA	107,33Ba	19,13Bab	8,67Aab	0,06Ca	1,8Ba	21,06Aa	0,11A a	305,66Aa
7-BRA 041152	1247,67 Aa	3362 Aa	884,33Bab	2373,33 Aa	105,33ABA	19,27ABab	10 Aa	0,08 Ba	0,63Ba	23,73Aa	0,08 Aa	347,33 Aa
8-BRA 041171	1255 Aa	3567,67 Aa	774,67Cab	2413 Aa	87,67B a	20 Aab	9,3 Aab	0,14 Ba	0,86 Ba	41,1 Aa	0,14 Aa	330,66 Aa
9-BRSMG Predileta	1125 Aa	2796,33 Aa	701,33Cb	1942 Aa	68,33Ba	15,76 BCb	5,63 ABb	0,09 Ba	0,53Ba	16,03Ba	0,09Ba	321A a

Letras maiúsculas diferentes na vertical indicam diferenças significativas entre as médias dos genótipos nos quatro ambientes (RS áreas I e II tabelas 5 e 6 e MG áreas I e II tabelas 7 e 8) pelo teste de Tukey a 5%. Letras minúsculas diferentes na vertical denotam diferenças significativas, pelo teste de Tukey a 5%, entre médias dos genótipos dentro da mesma área.

Tabela 8. Teores de magnésio (Mg), fósforo (P), enxofre (S), potássio (K), cálcio (Ca), manganês (Mn), ferro (Fe), cobalto (Co), níquel (Ni), cobre (Cu), zinco (Zn), arsênio (As) e rubídio (Rb), em mg kg⁻¹, em sementes de nove cultivares de *Oryza sativa* na área II MG.

Genótipos	Mg	P	S	K	Ca	Mn	Fe	Ni	Cu	Zn	As	Rb
1-BR IRGA 409	1333,33ABa	3328,67ABa	883Ba	2181,33 ABA	70,33Ba	19,9Bab	8,16 ABA	0,19Bbc	2,43Bab	22,3 Aa	0,1Aa	256 Aab
2-BR IRGA 410	1278 Aa	3167,67 Aa	942Ba	2053,67 Aa	76Aa	17,47ABab	9,2 Aa	0,05Cbc	3,03ABab	26,2 Aa	0,09Ba	258,33ABab
3-IRGA 417	1273,33 Aa	3381,67 Aa	908Ca	2303 ABA	83,67Aa	23,6Aa	9,67 ABA	0,5Aa	3,56ABab	23,56Aa	0,08 Aa	313,66Aa
4-BRS Atalanta	1199,33ABa	3107,67Aa	808 Bab	2043,33Aa	79 Ba	15,9ABb	9,13 ABA	0,11Bbc	8,53 Bb	22,3 Aa	0,08 Ba	178AB b
5-BRA 041255	1160,33ABa	2871,33ABa	786,67Cab	2026,33AB a	79,33Ba	15,73Bb	9,13 Aa	0,12Bbc	2,1 Bab	25,3 Aa	0,08Aa	277,33A a
6-BRA 041176	1076,33 Aa	2654,33ABa	652,33Bb	1900CBa	102,678Ba	18,5Bab	8,16ABA	0,23Bb	3,83ABA	22,9 Aa	0,1 Aa	251ABab
7-BRA 041152	1163,33 Aa	3153,67Aa	871,67Ba	2333,67Aa	84 Ba	18,03ABab	10,1 Aa	0,13 Bbc	1,63 Bab	24,16Aa	0,08 Aa	314,33 Aa
8-BRA 041171	1196,67 Aa	3346,33ABa	744,67Cab	2297,33 Aa	86Ba	18,7Aab	7,83 ABA	0,07Bbc	1,93ABab	24,1 Aa	0,12 Aa	292,33 Aa
9-BRSMG Predileta	1238 Aa	3728 Aa	927,66Ba	2290 Aa	72,67Ba	15,36ABab	8,17Aa	0,04Cc	1Ba	27,33ABa	0,09Ba	224,66Bab

Letras maiúsculas diferentes na vertical indicam diferenças significativas entre as médias dos genótipos nos quatro ambientes (RS áreas I e II tabelas 5 e 6 e MG áreas I e II tabelas 7 e 8) pelo teste de Tukey a 5%. Letras minúsculas diferentes na vertical denotam diferenças significativas, pelo teste de Tukey a 5%, entre médias dos genótipos dentro da mesma área.

Teor de ferro nos tecidos

A figura 1 mostra o teor de ferro na parte aérea (variando de 0,5 a 2,0 mg g⁻¹) e também nas raízes (variando de 10 a 35 mg g⁻¹) dos genótipos utilizados no experimento realizado em Minas Gerais.

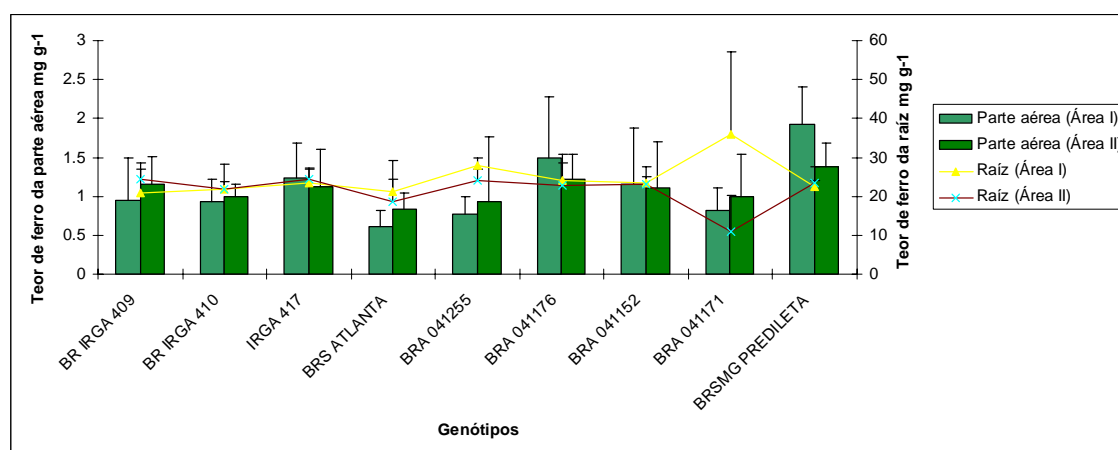


Figura 1. Teor de ferro na parte aérea e nas raízes dos genótipos cultivados em Minas Gerais. Os dados representam à média e as barras em preto indicam o desvio padrão (n=3, onde o n representa o numero de plantas).

A figura 2 mostra o teor de ferro na parte aérea (variando de 0,5 a 2,0 mg g⁻¹), na folha bandeira (variando de 0,3 a 2,0 mg g⁻¹) e da panícula (variando de 0,2 a 1,0 mg g⁻¹) no estadio leitoso de desenvolvimento dos genótipos utilizados no experimento realizado em Minas Gerais.

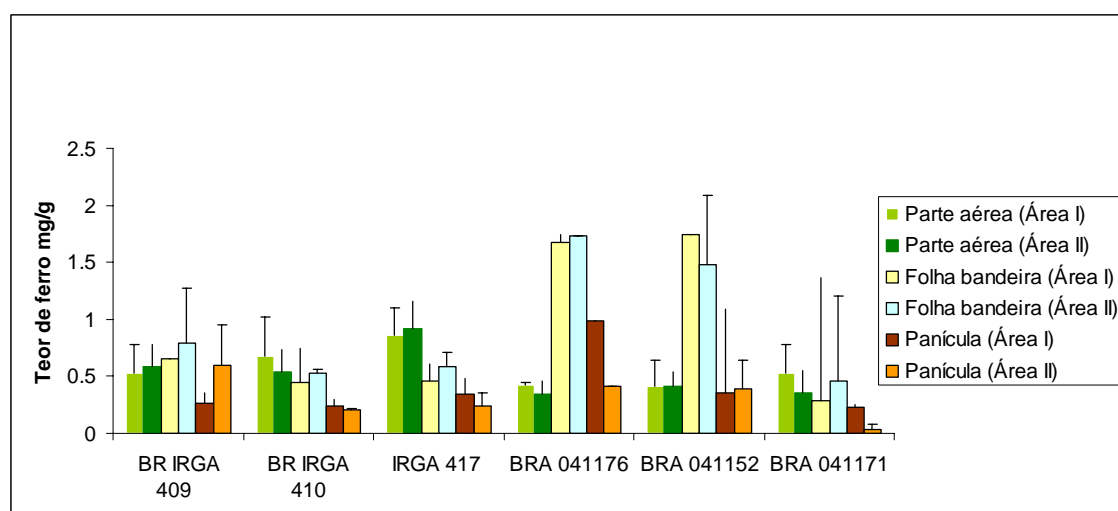


Figura 2. Teor de ferro na parte aérea, folhas bandeiras e panículas dos genótipos cultivados no estágio leitoso (R6) cultivados em Minas Gerais. Os dados representam a média e as barras em preto indicam o desvio padrão (n=3, onde o n representa o numero de plantas).

A figura 3 mostra o teor de ferro na parte aérea (variando de 0,5 a 1,0 mg g⁻¹), na folha bandeira (variando de 0,3 a 0,8 mg g⁻¹) e da panícula (variando de 0,2 a 0,5 mg g⁻¹) no estágio pastoso de desenvolvimento dos genótipos utilizados no experimento realizado em Minas Gerais.

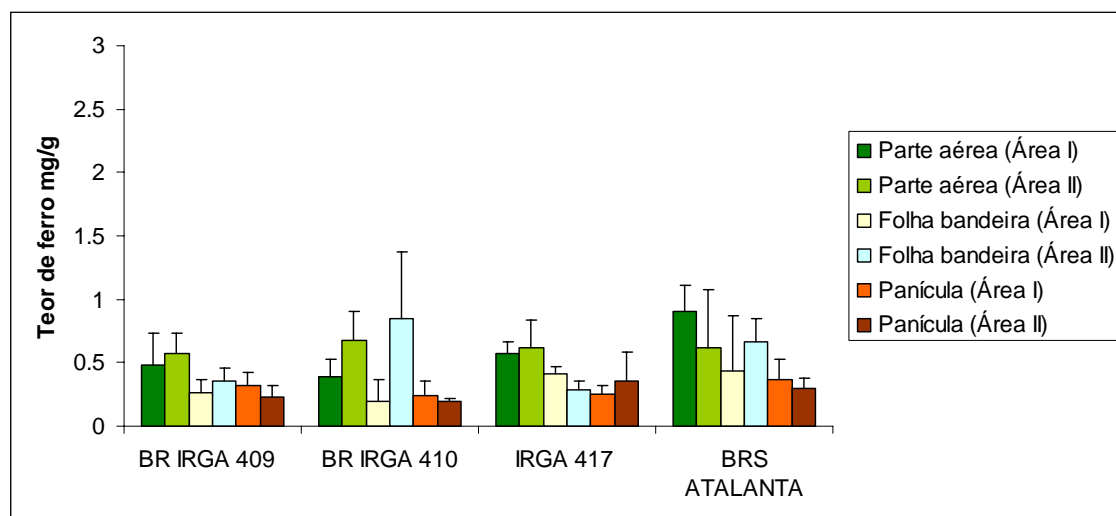


Figura 3. Teor de ferro na parte aérea, folhas bandeiras e panículas dos genótipos cultivados no estágio pastoso (R7) cultivados em Minas Gerais. Os dados representam a média e as barras em preto indicam o desvio padrão (n=3, onde o n representa o número de plantas).

Os dados de teor de ferro na parte aérea em folhas bandeira, panículas e sementes em distintos estágios de desenvolvimento foram submetidas à análise de correlação de Pearson.

Observou-se correlação positiva, porém com pequenos valores, entre o teor de ferro nas folhas bandeiras e panículas no estágio leitoso (R6) e pastoso (R7) no ciclo de desenvolvimento de sementes de arroz (Tabela 9). Ausência de correlação foi verificada entre folha bandeira no estágio leitoso (R6) e semente no estágio final (R8).

Estas análises foram realizadas apenas com os dados obtidos no experimento de MG porque as amostras de tecido vegetal para quantificação de ferro do experimento do RS não foram processadas.

Tabela 9. Correlação entre teor de ferro em folhas bandeiras, panículas nos estágios R6 e R7 e sementes no estágio final (R8) de desenvolvimento, em genótipos de *Oryza sativa*, cultivados no estado de Minas Gerais.

	Panícula (R6)	Panícula (R7)	Semente (R8)
Folha bandeira (R6)	0.53**		-0.0012
Folha bandeira (R7)		0.41**	

** Significativo a 1% de probabilidade pelo teste t.

Análise de correlação entre os nutrientes acumulados nas sementes

Os dados de nutrientes acumulados nas sementes (tabelas 5 a 8) foram utilizados para a análise de correlação de Pearson a fim de verificar a correlação existente no teor do mineral ferro no grão em relação aos outros nutrientes também acumulados. Foi realizada uma análise de correlação dos dois experimentos conjuntamente (tabela A7, anexos). Foram feitas ainda análise de trilha para os dois experimentos em conjunto e estão apresentados na tabela A8 (anexos).

As análises de correlação foram feitas para cada experimento separadamente. No experimento realizado em MG foi verificada uma correlação positiva e significativa do Fe com Mg, P, S, K, Ca, Mn e Ni. Por outro lado, correlação negativa e significativa foi observada entre o Fe e Zn (tabela 10)

Tabela 10. Análise do coeficiente de correlação de Pearson, para verificar a correlação de todos os minerais em relação ao mineral Fe para o experimento realizado nas duas áreas em MG.

	Mg	P	S	K	Ca	Mn	Co	Ni	Cu	Zn	As	Rb
Fe	0,4**	0,48**	0,51**	0,43**	0,36**	0,36**	0,18	0,27*	0,19	-0,27*	0,07	-0,01

** Significativo a 1% de probabilidade pelo teste t.

* Significativo a 5% de probabilidade pelo teste t.

Além de ser realizado o efeito de correlação entre os minerais, foi realizado também um teste da análise de trilha a fim de isolar o fator Fe (variável básica) e verificar correlação direta e indireta dos outros nutrientes minerais acumulados no grão (variáveis explicativas). Como apresentado na tabela 9 foi verificado efeito direto entre o Fe e as variáveis P (0,47), S (0,42) e Ca (0,42). Os dados da análise de trilha completa para o experimento de MG estão apresentados na tabela A9.

Tabela 11. Análise de trilha da variável básica Fe com as variáveis explicativas P, S e Ca para o experimento realizado nas duas áreas de MG.

VARIÁVEL =====> P

EFEITO DIRETO SOBRE	Fe	.47378115
EFEITO INDIRETO VIA	Mg	-.15660136
EFEITO INDIRETO VIA	S	.29256977
EFEITO INDIRETO VIA	K	-.10768919
EFEITO INDIRETO VIA	Ca	.05806641
EFEITO INDIRETO VIA	Mn	-.14156568
EFEITO INDIRETO VIA	Co	.00243809
EFEITO INDIRETO VIA	Cu	.02083875
EFEITO INDIRETO VIA	Zn	.06768504
EFEITO INDIRETO VIA	Ni	.01740845
EFEITO INDIRETO VIA	As	-.03971189
EFEITO INDIRETO VIA	Rb	-.00737243
EFEITO INDIRETO VIA	Mo	.00567189
TOTAL		0.485519

VARIÁVEL =====> S

```

EFEITO DIRETO SOBRE Fe .42591721
EFEITO INDIRETO VIA Mg -.14359276
EFEITO INDIRETO VIA P .32544833
EFEITO INDIRETO VIA K -.06781597
EFEITO INDIRETO VIA Ca -.01108736
EFEITO INDIRETO VIA Mn -.10697979
EFEITO INDIRETO VIA Co .01542309
EFEITO INDIRETO VIA Cu .01574695
EFEITO INDIRETO VIA Zn .04962765
EFEITO INDIRETO VIA Ni .00778181
EFEITO INDIRETO VIA As -.00127179
EFEITO INDIRETO VIA Rb -.00041986
EFEITO INDIRETO VIA Mo .00424849
TOTAL

```

0.513026

VARIÁVEL =====> Ca

```

EFEITO DIRETO SOBRE Fe .4162079
EFEITO INDIRETO VIA Mg .00240302
EFEITO INDIRETO VIA P .06609863
EFEITO INDIRETO VIA S -.01134601
EFEITO INDIRETO VIA K -.03127221
EFEITO INDIRETO VIA Mn -.08949317
EFEITO INDIRETO VIA Co .00710658
EFEITO INDIRETO VIA Cu .0093579
EFEITO INDIRETO VIA Zn -.00490376
EFEITO INDIRETO VIA Ni .01204111
EFEITO INDIRETO VIA As -.0088746
EFEITO INDIRETO VIA Rb -.00650267
EFEITO INDIRETO VIA Mo .00084527
TOTAL

```

0.361668

COEFICIENTE DE DETERMINAÇÃO ====> .51337301
EFEITO DA VARIÁVEL RESIDUAL : .69758655

No experimento realizado nas duas áreas no RS foi verificada uma correlação positiva e significativa do Fe com Mg e P (tabela 12)

Tabela 12. Análise do coeficiente de correlação de Pearson, para verificar a correlação de todos os minerais em relação ao mineral Fe para o experimento realizado em RS.

	Mg	P	S	K	Ca	Mn	Cu	Zn	Ni	As	Rb
Fe	0,36**	0,33*	0,10	0,23	-0.19	-0.002	0,015	-0.18	-0.18	0,05	0,23

** Significativo a 1% de probabilidade pelo teste t.

* Significativo a 5% de probabilidade pelo teste t.

Além de ser realizado o efeito de correlação entre os minerais, foi realizada a análise de trilha a fim de isolar o fator Fe (variável básica) e verificar correlação direta dos outros nutrientes minerais acumulados no grão (variáveis explicativas). Como apresentado na tabela 13 foi verificado efeito direto entre o Fe e as variáveis P (0,86). Os dados da análise de trilha completa para o experimento realizado no RS estão apresentados na tabela A10 (anexos).

Tabela 13. Análise de trilha da variável básica Fe com a variável explicativa P no experimento realizado nas duas áreas do RS

VARIÁVEL =====> P

EFEITO DIRETO SOBRE	Fe	.86340286	
EFEITO INDIRETO VIA	Mg	-.11490024	
EFEITO INDIRETO VIA	S	.00899774	
EFEITO INDIRETO VIA	K	-.40585015	
EFEITO INDIRETO VIA	Ca	.0049908	
EFEITO INDIRETO VIA	Mn	-.14871366	
EFEITO INDIRETO VIA	Co	.09059436	
EFEITO INDIRETO VIA	Cu	-.02670292	
EFEITO INDIRETO VIA	Zn	.03637048	
EFEITO INDIRETO VIA	Ni	.00102417	
EFEITO INDIRETO VIA	As	-.03562382	
EFEITO INDIRETO VIA	Rb	.07150488	
EFEITO INDIRETO VIA	Mo	-.01222851	
TOTAL			0.332866

Analise de expressão gênica

Amostras de folha bandeira nos estádios leitoso e final de desenvolvimento dos genótipos BRIRGA 410 e IRGA 410 nas duas áreas experimentais do experimento realizado na EMBRAPA-Clima Temperado. Os dados de literatura indicam que o gene *OsNRAMP2* está expresso em folhas bandeiras de genótipos de arroz (Narayanan *et al.*, 2007).

Os resultados apresentados na tabela 14 mostram a expressão do gene *OsNRAMP2* no estágio leitoso de desenvolvimento. Para todas as análises de expressão gênica geradas pelo Real Time foi utilizado o método comparativo de Δ_{CT} , o qual se baseia na diferença de expressão de um gene alvo, neste caso específico *OsNRAMP2* em relação a um gene constitutivo 18S.

Os resultados apresentados na tabela 15 mostram a expressão do gene *OsNRAMP2* no estágio final de desenvolvimento. Para todas as análises de expressão gênica geradas pelo Real Time foi utilizado o método comparativo de Δ_{CT} , o qual se baseia na diferença de expressão de um gene alvo, neste caso específico *OsNRAMP2* em relação a um gene constitutivo 18S.

Os dados apresentados nas tabelas a seguir identificam que não houve variação na expressão deste gene entre as duas condições experimentais, área I e área II e entre os genótipos. Não foi verificada diferenças de expressão pelo método do $2^{-\Delta\Delta CT}$, este método se baseia na expressão relativa do gene *OsNRAMP2* com o gene endógeno *18S*. O desvio padrão foi muito grande, por isso não foi identificada diferença significativa.

Tabela 14. Resultado da expressão gênica por Real Time PCR para o gene OsNRAMP2 em folhas bandeiras dos genótipos BRIRGA 410 e IRGA 417 de *Oryza sativa* no estágio leitoso (R6) de desenvolvimento. Foi utilizado o método comparativo de $\Delta\Delta\text{CT}$.

Amostras	Ct NRAMP2 ^{a,b}	Ct 18S ^{a,b}	ΔCt ^{c,d}	$\Delta\Delta\text{Ct}$ ^e	$(2^{-\Delta\Delta\text{CT}})$
Área I BR IRGA 410	31,65±0,94	31,72±0,47	0,067±1,18	0±1,18	1 (0,43-2,27)
Área II BR IRGA 410	32,42±0,36	31,12±1,11	1,30±1,21	1,37±1,21	0,38 (0,16-0,89)
Área I IRGA 417	29,56±1,56	29,35±1,14	0,208±1,64	0,276±1,64	0,82(0,26-2,58)
Área II IRGA 417	31,90±0,51	30,70±2,86	1,19±1,83	1,267±1,62	0,41(0,16-1,48)

Área I do experimento realizado no Rio Grande do Sul. Área II do experimento realizado em Minas Gerais.

^aForam calculadas as médias a partir das replicatas técnicas (Dados não apresentados).

^b Os desvios padrão acompanham o valor de cada média. ^c Os valores de ΔCT (técnico) foram obtidos subtraindo-se o Ct do gene alvo (OsNRAMP2) pelo Ct do endógeno (18S).

^d Cada valor de ΔCT (técnico) é acompanhado pela sua variância, calculada com base nos desvios padrão gerados pelas replicatas técnicas.

^d ΔCT (médio) é calculado a partir da média dos ΔCT (técnico) e a variância é calculada sobre os desvios padrão gerados pelas replicatas biológicas.

^e $\Delta\Delta\text{CT}$ é calculado subtraindo-se o ΔCT (médio) do alvo pelo valor de ΔCT (médio) do calibrador (Área I BR IRGA 410).

Tabela 15. Resultado da expressão gênica por Real Time-PCR para o gene NRAMP2 em folhas bandeiras dos genótipos BRIRGA 410 e IRGA 417 de *Oryza sativa* no estágio final (R8) de desenvolvimento. Foi utilizado o método comparativo de $\Delta\Delta\text{CT}$.

Amostras	Ct NRAMP ^{a,b}	Ct 18S ^{a,b}	ΔCt ^{c,d}	$\Delta\Delta\text{Ct}$ ^e	$(2^{-\Delta\Delta\text{CT}})$
Área I BR IRGA 410	30,10±4,87	30,06±1,56	0,045±2,53	0±2,53	1(0,17-5,8)
Área II BR IRGA 410	30,00±0,57	30,54±0,36	(-0,54)±0,97	(-0,58)±0,97	1,50 (0,76-2,93)
Área I IRGA 417	30,34±0,63	30,95±0,84	(-0,60)±1,21	(-0,65)±1,21	1,57 (0,67-3,64)
Área II IRGA 417	29,55±1,10	30,60±2,57	(-1,056)±1,91	(-1,10)±1,91	2,14 (0,56-8,11)

Área I do experimento realizado no Rio Grande do Sul. Área II do experimento realizado em Minas Gerais.

^aForam calculadas as médias a partir das replicatas técnicas (Dados não apresentados).

^b Os desvios padrão acompanham o valor de cada média.

^c Os valores de ΔCT (técnico) foram obtidos subtraindo-se o CT do gene alvo (OsNRAMP2) pelo CT do endógeno (18S).

^d Cada valor de ΔCT (técnico) é acompanhado pela sua variância, calculada com base nos desvios padrão gerados pelas replicatas técnicas e ΔCT (médio) é calculado a partir da média dos ΔCT (técnico) e a variância é calculada sobre os desvios padrão gerados pelas replicatas biológicas.

^e $\Delta\Delta\text{CT}$ é calculado subtraindo-se o ΔCT (médio) do alvo pelo valor de ΔCT (médio) do calibrador (Área I BR IRGA 410).

Discussão

Os elementos minerais estão presentes no solo como íons livres ou adsorvidos nas superfícies das partículas. As mais importantes propriedades do solo que influenciam na disponibilidade dos minerais são: pH, condições redox, capacidade de troca de cátions (CTC), atividade da microbiota, estrutura do solo, matéria orgânica e conteúdo de água (Frossard *et al.*, 2000).

Com base nos dados da tabela 2, as quantidades de Fe no solo do experimento realizado em MG foram superiores (667,6 e 1339,8 mg kg⁻¹) ao experimento realizado no RS (236,1 e 152,7 mg kg⁻¹). Os teores de Fe acumulados no grão dos genótipos cultivados em MG foram superiores (5,63 e 11,73 mg kg⁻¹) comparados ao experimento realizado no RS (3,93 e 7,56 mg kg⁻¹).

Diversos métodos são utilizados para a quantificação dos micronutrientes dos solos. O mais utilizado é o extrator de Mehlich-1 (Oliveira & Nascimento, 2006). Este extrator foi utilizado em nosso trabalho com a finalidade de extração do ferro total no solo. Os dados de solo dos nossos experimentos não se tornam representativos, pois não identifica o valor real do ferro disponível na solução do solo que seria utilizado pelas plantas.

Os teores de minerais nas sementes dependem dos processos de mobilização do solo, absorção pelas raízes, translocação, redistribuição na planta e deposição em sementes (Grusak & DellaPena, 1999). Com base nos resultados da tabela 3 se observaram diferenças estatisticamente significativas para o teor de minerais na semente dos genótipos avaliados quando cultivados nos diferentes ambientes com exceção dos micronutrientes Fe, Cu e Zn. Apesar de não haver diferença entre os genótipos na acumulação de Fe e Zn, os teores desse último acumulado no grão eram muito maiores (44,2 mg Kg⁻¹) do que os de Fe (11,73 mg Kg⁻¹), o que está de acordo com a variabilidade normal para arroz. Dados apresentados por Graham (1999) mostram teores de Fe em sementes de arroz marrom e arroz normal variam entre 7,5 a 24,5 µg g⁻¹ enquanto que para o Zn variam entre 13,5 a 39 µg g⁻¹.

Os teores de minerais nas sementes dependem dos processos de: mobilização do solo, absorção pelas raízes, translocação, redistribuição na planta e deposição em sementes (Grusak & DellaPena, 1999).

Com base nos resultados da tabela 3 se observaram diferenças estatisticamente significativas para o teor de minerais na semente dos genótipos avaliados quando cultivados nos diferentes ambientes com exceção dos micronutrientes Fe, Cu e Zn. Apesar de não haver diferença entre os genótipos na acumulação de Fe e Zn, os teores desse último acumulado no grão eram muito maiores (44,2 mg Kg⁻¹) do que os de Fe (11,73 mg Kg⁻¹), o que concorda com os dados apresentados por Graham (1999), nos quais os teores de Fe em sementes de arroz marrom e arroz normal variam entre 7,5 a 24,5 µg g⁻¹ enquanto que para o Zn variam entre 13,5 a 39 µg g⁻¹.

O trabalho apresentado por White & Broadley (2009) destacou a variação genética existente no perfil de acumulação de nutrientes no grão de cereais. Os

resultados apresentados por esses autores, corroboram com os resultados mostrados em nossos experimentos. Essa variação na acumulação de nutrientes entre os genótipos é atribuída em parte por variação alélica no cromossomo que promove senescência antecipada e remobilização de nutrientes das folhas para o grão (White & Broadley 2009). A diferença entre os genótipos na mobilização de nutrientes para o grão é influenciada pelo aspecto, morfologia e tamanho do grão, bem como o tamanho do embrião e também a espessura das camadas de tecidos que compõe o grão (White & Broadley 2009).

O processo de enchimento do grão em cereais envolve a transferência de assimilados diretamente do xilema para o grão e também a remobilização de assimilados de órgãos vegetativos, através do floema, contendo fonte de assimilados (Yang & Zhang, 2006).

A absorção de Mg^{+2} ocorre por canais de cations (White & Broadley, 2009). Os altos níveis de Mg acumulados em sementes de arroz (664,33 a 1474 mg kg^{-1}) observado neste experimento podem ser explicados pela alta mobilidade desse mineral no floema sendo translocados para as sementes (White & Broadley, 2009).

O P foi o mineral que apresentou as maiores quantidades de acumulação no grão dentre os macronutrientes variando de 1,539 a 3,623 g kg^{-1} . O P está na forma de ácido fítico sendo mio-inositol (1,2,3,4,5,6-hexaphosphate, IP_6) que nas sementes representa 75% do fósforo total (Raboy, 2001). Em plantas, O IP_6 está na forma aniônica denominada fitato. O fitato está associado aos sais de Ca, Mg e K nas sementes, entretanto em alguns casos os cátions ligados à proteína e amido são conhecidos como fitina. A fitina está também associada ao Fe e Zn (Raboy, 2001). Em sementes de arroz, a fitina está na camada de aleurona e constitui entre 1 a 3% do peso seco de sementes de cereais. O papel da fitina em sementes de arroz é 1) armazenamento de P, 2) de energia, 3) imobilizador de cátions divalentes necessários para controlar processos celulares, que são ativos no processo de germinação e 4) controla prontamente a disponibilidade de P nas sementes. A fitina representa cerca de 50-80% de P em sementes de gramíneas e leguminosas (Angel *et al.*, 2002).

O K está presente em altas quantidades nas sementes de arroz, como mostrado neste experimento (1,456 a 2,355 g kg^{-1}). O K é absorvido pelas raízes contra o gradiente de concentração. Esse mineral tem como uma das formas de transporte nas plantas, o transporte de baixa afinidade com Na^+ , Rb^+ e Ca^{+2} . Apesar de transportar esses nutrientes é preferencial a absorção de K^+ (Fox & Guerinot, 1998). De acordo com o trabalho de Ogawa *et al.* (1979) o K^+ está presente predominantemente no

endosperma de sementes de arroz. Segundo esse autor, o K^+ participa da síntese de amido catalizada por UDP-glicose.

O mineral Rb^+ , apesar de não ser um nutriente essencial para as plantas, está presente acumulado nas sementes em altos níveis (97 a 347,33 $mg\ kg^{-1}$) comparado aos micronutrientes. A quantidade de Rb no solo em regiões onde se predominam rochas gnaisses, como é o caso das regiões de Minas Gerais e Rio Grande do Sul onde foram realizados os experimentos do presente trabalho, atingem cerca de 100 $mg\ kg^{-1}$ (Faure, 1998). Os altos índices de Rb acumulados no grão de arroz podem ser explicados pelo fato desse mineral poder ser transportado pelas raízes com K^+ por transportador caracterizado de baixa afinidade. Conseqüentemente, a absorção de K^+ levará a absorção de Rb^+ em menores proporções (Fox & Guerinot, 1998). Além disso, bioquimicamente Rb^+ e NH_4^+ são os melhores substitutos na ativação enzimática, pois como cofatores enzimáticos são preferencialmente requeridos cátions monovalentes (Evans & Sorger, 1966). De acordo com Lauchli & Epstein (1970), o mecanismo de Rb^+ e K^+ são similares, porém quando se trata da translocação desses minerais no xilema a translocação de K^+ (7,4 $\mu moles\ g^{-1}\ h^{-1}$) é maior comparado ao Rb^+ (6,5 $\mu moles\ g^{-1}\ h^{-1}$).

Dentre os macronutrientes, o mineral Ca é o que possui os menores teores de acumulação nas sementes (variando de 70,33 a 178,33 $mg\ Kg^{-1}$). O Ca possui baixa mobilidade fisiológica, com baixa razão na acumulação, transporte célula-célula e transporte no floema. O Ca está acumulado nas plantas principalmente em folhas (Clarkson & Hanson, 1980).

O mineral Zn é absorvido pelas raízes por transportadores da família ZIP (Zinc Iron Protein) e pode ser transportado como íon livre Zn^{+2} ou complexados com fitosiderósforos. No floema, o mineral Zn é transportado por transportadores da família ZIP, o mineral é complexado com ácidos orgânicos e nicotianamina para aumentar a disponibilidade dentro da planta (White & Broadley, 2009). Apesar da baixa mobilidade desse mineral no floema os teores acumulados nas sementes foram 16,03 a 44,3 $mg\ Kg^{-1}$. O trabalho de White & Broadley (2009) mostrou que os níveis de Zn em sementes de arroz cultivadas sob condições normais foram 14-58 $mg\ Kg^{-1}$.

O Cu é um íon disponível no solo. Os teores de Cu acumulados nas sementes neste trabalho variam entre 0,53 a 6,53 $mg\ Kg^{-1}$. O Cu^{+2} é transportado no floema e xilema como minerais quelados e que os transportadores da família YSL são responsáveis pelo transporte para toda a planta (Curie & Briat, 2003).

O Mn é considerado um elemento móvel no floema. Seus teores acumulados nas sementes neste trabalho variaram entre 13,3 a 33,7 $mg\ Kg^{-1}$. Esse mineral é transportado

na planta por um transportador NRAMP (*Natural Resistance Associated Macrophage Protein*). Esse transportador foi caracterizado em *A.thaliana* e é responsável por transportar cátions divalentes como Fe^{+2} , Cu^{+2} e Zn^{+2} (Curie & Briat, 2003).

Os dados apresentados por Meharg *et al.*, (2008) caracterizam o teor de minerais acumulados em sementes de arroz branco e marrom. Nesse trabalho os genótipos de arroz foram cultivados sob o excesso de As. O teor desse mineral estava entre 0,28 a 0,61 $mg\ Kg^{-1}$. De acordo com os dados desse trabalho, As estava localizado na superfície do grão. No presente trabalho de tese de mestrado, os resultados dos teores de nutrientes acumulados são do endosperma, isso pode explicar os níveis baixos de As (0,08 a 0,66 $mg\ Kg^{-1}$) presentes nas sementes. Os nutrientes acumulados Fe, Zn, Mn e Cu também estão localizados na superfície do grão. Nessa região é localizada a camada de aleurona e o pericarpo, regiões ricas em células de lipídios e proteínas. Entretanto, Cd e Ni tiveram uma localização no interior do grão, localizando preferencialmente no endosperma. Os teores de Ni variaram entre 0,04 a 0,55 $mg\ Kg^{-1}$.

A análise referente ao experimento realizado no estado de MG mostrou uma correlação positiva e significativa do Fe com todos os macronutrientes acumulados no grão e os micronutrientes Ni e Mn, entretanto foi verificada correlação negativa entre o Fe e Zn (tabela 8).

O mineral Ni é transportado com nicotianamina (NA) nos vasos do xilema (Kim *et al.*, 2005). Isso pode explicar uma correlação positiva do Fe com o Ni. Esse mineral está presente em altas proporções nos vasos xilemáticos. Trabalho realizado por Meharg *et al.* (2008) identificou através de ICP-MS em sementes de arroz que o Ni está predominantemente no endosperma. Isso pode justificar a correlação entre Fe e Ni.

Segundo Meharg *et al.* (2008) os cátions como Fe, Cu, Mn Zn e As estão depositados na camada de aleurona localizada na superfície de sementes de arroz. Isso pode caracterizar baixas quantidades de minerais no endosperma e a falta de correlação entre o Fe e a maioria dos micronutrientes. Além disso, de acordo com trabalho mostrado por Frossard *et al.* (2000) sementes de cereais possuem menores teores de Fe Zn e Ca comparados a sementes de leguminosas. De forma geral, as sementes de cereais possuem baixas quantidades de fitato e isto está de acordo com o baixo conteúdo de minerais acumulados, comparados aos grãos de leguminosas (Lot, 1995).

Os dados de correlação identificaram as relações entre o Fe e os nutrientes, mas essa metodologia não evidencia a importância dos efeitos diretos e indiretos de cada nutriente para ser acumulado na semente. A fim de verificar os efeitos diretos e

indiretos das relações entre os nutrientes foi realizada a metodologia de análises de trilhas.

Os dados de análise de trilha, mostrados na tabela 9, do experimento realizado em MG mostrou efeito direta de alta magnitude do Fe com o P, S e Ca. Os dados da análise de trilha do experimento realizado no RS (Tabela 11) mostraram a associação direta do Fe com o P. Na dinâmica de solos alagados o Fe é o mineral que mais é alterado quimicamente. Nessas condições de cultivo a elevação de pH aumenta a difusão de P pela solução do solo (Ponnamperuma, 1978). O mineral P possui alta solubilidade em solos alagados (Ponnamperuma *et al.*, 1972). A alta disponibilidade de ferro na solução do solo pode favorecer maior absorção pelas plantas. Além disso, o mineral P apresentou o maior teor nas sementes, dentre os nutrientes analisados, estando associados ao fitato no endosperma das sementes (Ozturk *et al.*, 2006).

O S é absorvido pelas raízes como SO_4^{-2} e transportado para toda a planta na forma inorgânica até chegar às folhas. O SO_4^{-2} ao chegar às folhas é armazenado como sulfato ou na forma reduzida (Howarth *et al.*, 2008). O S é armazenado em plastídeos nas folhas e são armazenados predominantemente como aminoácidos cisteínas (Howarth *et al.*, 2008). A proteína Rubisco é uma fonte de armazenamento de aminoácidos contendo S, como cisteína (Gilbert *et al.*, 1997). O processo de senescência que acontece durante o enchimento do grão envolve a remobilização de S para o endosperma, pela degradação das proteínas. O armazenamento de 75% de S no endosperma está predominantemente na forma de SO_4^{-2} (Howarth *et al.*, 2008). O S está armazenado juntamente com as glutelinas no endosperma de sementes de arroz (Shewry & Halford, 2002).

As análises referentes ao experimento realizado no estado de MG mostraram uma correlação positiva e significativa do Fe com Mg e P (tabela 10). A correlação positiva entre o Fe o P já foi relatada (Ozturk *et al.*, 2006). Como já descrito anteriormente, o processo de enchimento do grão é favorecido pelo processo de senescência. Diante disso, o processo de senescência que ocorre nas folhas faz com que ocorra a degradação da clorofila. Com isso o mineral Mg, associado às moléculas de clorofila, são removidos pela ação da Mg dequelatase (Clarkson & Hanson, 1980). O Mg é então remobilizado para os órgãos fontes, como as sementes já que esse mineral é altamente móvel no floema (White & Broadley, 2009).

Os dados apresentados nas figuras 2 e 3, no qual mostra o teor de ferro na folha bandeira e panícula dos genótipos utilizados neste experimento. De acordo com Yang & Zhang (2006) o processo de enchimento de grão em plantas monocárpicas, como o

arroz, envolve o processo de senescência principalmente da folha bandeira. O estresse abiótico induz a síntese do hormônio ácido abscísico, que é considerado o hormônio do estresse. A ação deste hormônio implica em alterações fisiológicas na plantas que podem culminar com a senescência. Em plantas de arroz, a senescência é primeiramente percebida nas folhas bandeiras, comparado às outras folhas. Conseqüentemente há uma remobilização de assimilados da folha bandeira para o grão, pois essa folha está associada diretamente com o grão (Bay & Choudhuri *et al.*, 1981). De acordo com esses autores, se remover os órgãos dreno como às panículas há um atraso no processo de senescência. Resultados apresentados por Biswas & Choudhuri (1980) concordam com os dados acima, em que a folha bandeira é metabolicamente ativa durante o processo de enchimento do grão.

Entretanto, os valores de correlação positiva entre folha bandeira e panículas nos estádios leitoso (R6) e pastoso (R7) de desenvolvimento (tabela 9), foram muito baixos para aferir alguma correlação do teor de ferro, deste trabalho. Além disso, os dados das tabelas 14 e 15, mostra a expressão do gene *OsNRAMP2* e não foi verificada diferença significativa entre os tratamentos analisados, isso pode ser explicado pelos altos valores do desvio padrão, por ser um experimento de campo, as amostras biológicas estão muito sujeitas a diferenças. O gene *OsNRAMP2* está relacionado ao transporte de cátions divalentes no floema (Curie & Briat, 2003). O trabalho de Narayanan *et al.* (2007) o gene *OsNRAMP2* teve alta expressão em folha bandeira de genótipos de arroz (os genótipos utilizados foram: Cocodrie, Taipei 309, IR58 e IR68144), durante o estágio médio de desenvolvimento do grão. Entretanto, os nossos resultados para os genótipos BRIRGA 410 e IRGA 417 não foi verificada a expressão deste gene em folha bandeira.

O trabalho apresentado por Stangoolis *et al.*, (2007) identificou QTLs (*quantitative trait loci*) para fitato e micronutrientes acumulados em grãos de arroz. Este trabalho mostra que o padrão de acumulação de nutrientes no grão é afetado por muitos genes. A concentração de fitato tem dois QTLs localizados no cromossomo 5 e 12, concentração de Fe tem QTLs localizados no cromossomo 3, 8 e 12 e a concentração de Zn tem dois QTLs localizados no cromossomo 1 e 12. A presença de múltiplos QTLs entre fitato, Fe e Zn sugerem que múltiplos genes estão envolvidos na acumulação de minerais nas sementes. Entretanto, QTLs para fitato não está localizado no mesmo cromossomo, comparado a Fe, Zn e Mn, isto indica que o uso de marcadores moleculares pode ser utilizado para o aumento no teor de nutrientes nas sementes sem alterar os níveis de fitato nos grãos (Stangoolis *et al.*, 2007).

O trabalho apresentado por Shi *et al.* (2008) identificou QTLs no padrão de acumulação de P e Zn em sementes de trigo. Nesse trabalho caracterizou-se a presença de quatro QTLs para a concentração de Zn no grão e seis QTLs para a concentração de P no grão. Shi *et al.*, (2008) identificou QTLs comuns para a concentração de Zn e P, identificando que o aumento na concentração de Zn na semente pode implicar também, em altas concentrações de P em sementes de trigo. Conclui-se que a seleção do gene para o aumento de P pode aumentar os níveis de Zn nas sementes. Apesar dos resultados deste trabalho terem mostrado correlação negativa entre P e Zn, esta correlação foi considerada baixa.

O teor de nutrientes no grão é dependente de fatores ambientais e genéticos (Vreugdenthl *et al.*, 2004). De acordo com esse grupo de pesquisa os diferentes tipos de solos resultam na variação de acúmulo de micronutrientes no grão. Há correlação entre os níveis de micronutrientes acumulados no grão e que essa correlação é consequência de fatores gênicos, mecanismos moleculares controlando absorção e metabolismo de minerais. Neste trabalho foram identificados QTLs possíveis para acumulação de cátions em sementes, dentre os genes identificados se destacam: P-ATPases, transportadores de magnésio, FRO2, ZIP e NAS. Vreugdenthl *et al.* (2004) identificou que a homeostase mineral nas sementes são controladas por vários genes. Foram encontrados QTLs comuns para K, Ca, Mn, P e fitato, isso se torna importante uma vez que genes candidatos podem ser alvos para o aumento do conteúdo mineral nas sementes.

Conclusões

Os solos das áreas onde foram realizados os experimento em MG possuem maiores teores de ferro no solo comparado às áreas dos experimentos realizados no RS. Isso refletiu em maiores teores de ferro acumulados no grão em genótipos cultivados em MG. Entretanto, deve-se levar em conta que o extrator de ferro utilizado para a análise do solo (Mehlich-1) extrai o ferro total do solo, não especificando a fração de ferro disponível para ser absorvida pelas plantas. O teor de nutrientes no grão é dependente de fatores ambientais e genéticos. Diferentes tipos de solos, e diversos fatores bióticos e abióticos resultam na variação de teor de micronutrientes no grão.

Diferenças estatisticamente significativas foram observadas para o teor de minerais na semente dos genótipos avaliados quando cultivados nos diferentes ambientes com exceção dos micronutrientes Fe, Cu e Zn.

Os dados de correlação de Pearson apresentados no trabalho não evidenciam o efeito direto e indireto de cada nutriente acumulado e por isso foram feitas análises de trilha. Por esta análise, mostraram correlação direta do Fe com o P, S e Ca acumulados nas sementes de arroz no experimento realizado em MG e correlação direta do Fe com P acumulados nas sementes de arroz no experimento realizado no RS. Isso evidencia que se aumentar o teor de ferro nas sementes aumentam também o teor de P isso pode estar associado com o mineral ferro estar presente nos fitatos.

Os dados de teores de ferro acumulado nas folhas bandeiras de arroz e nas panículas de plantas em diferentes estádios de desenvolvimento evidenciam que o teor de ferro na folha bandeira não está relacionado com o teor de ferro na panícula, isso pode ser explicado pelos baixos valores nos índices de correlação.

A expressão do gene *OsNRAMP2* não apresentou diferenças entre os tratamentos utilizados. Por ser um experimento de campo as amostras utilizadas apresentam grandes variações, podendo ser comprovadas pelo alto valor de desvio padrão.

ANEXOS

Tabela A1. Resumo da ANOVA para as variáveis teores de: magnésio (Mg), fósforo (P), enxofre (S), potássio (K), cálcio (Ca), manganês (Mn), ferro (Fe), níquel (Ni), cobre (Cu), zinco (Zn), arsênio (As), rubídio (Rb) nas sementes de nove genótipos de arroz, na área I do experimento realizado no Rio Grande do Sul.

FV	GL	Quadrado Médio											
		Teor de minerais (mg kg ⁻¹)											
		Mg	P	S	K	Ca	Mn	Fe	Ni	Cu	Zn	As	Rb
Bloco	2	5589.37	3642.33	8295.70	22146.81	131.81	35	11.34	0.009	3.51	260.11	0.09	2508
Genótipo	8	75099.5*	426467*	54295.53*	184441.62*	1561.17^{ns}	49.11*	2.79^{ns}	0.06*	3^{ns}	129.46^{ns}	0.07*	610.25^{ns}
Residuo	16	17552	138314.95	10424.45	50883.93	701.06	17.12	2.11	0.003	1.54	114.69	0.01	437.25
CV (%)		14.7	17.53	8.31	13.81	18.62	17.18	27.89	15.38	24.96	34.42	50	17

*Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F

^{ns} não significativo

GL: Graus de liberdade. FV: Fonte de variação. CV (%): Coeficiente de variação

Tabela A2. Resumo da ANOVA para as variáveis teores de: magnésio (Mg), fósforo (P), enxofre (S), potássio (K), cálcio (Ca), manganês (Mn), ferro (Fe), níquel (Ni), cobre (Cu), zinco (Zn), arsênio (As), rubídio (Rb) nas sementes de nove genótipos de arroz, na área II do experimento realizado no Rio Grande do Sul.

FV	GL	Quadrado Médio											
		Teor de minerais (mg kg ⁻¹)											
		Mg	P	S	K	Ca	Mn	Fe	Ni	Cu	Zn	As	Rb
Bloco	2	81195.59	662987.81	3993.59	192879.37	2006.92	48.93	3.17	0.02	1	142.92	0.003	11802.81
Genótipo	8	34612.48*	336131.42*	24930.06*	211230.75*	2224.95*	3.76^{ns}	2.95^{ns}	0.01^{ns}	0.35^{ns}	280.1*	0.004*	3368.59^{ns}
Residuo	16	16429.46	191991	10849	76575	512.75	3.97	1.39	0.006	0.48	153	0.001	1505.14
CV (%)		10.52	14.32	8.89	13.49	17.87	13.49	20.92	18.51	30	47.18	17.42	17.51

*Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F

^{ns} não significativo

GL: Graus de liberdade. FV: Fonte de variação. CV (%): Coeficiente de variação

Tabela A3. Resumo da ANOVA para as variáveis teores de: magnésio (Mg), fósforo (P), enxofre (S), potássio (K), cálcio (Ca), manganês (Mn), ferro (Fe), níquel (Ni), cobre (Cu), zinco (Zn), arsênio (As), rubídio (Rb) nas sementes de nove genótipos de arroz, na área I do experimento realizado em Minas Gerais.

FV	GL	Quadrado Médio											
		Teor de minerais (mg kg ⁻¹)											
		Mg	P	S	K	Ca	Mn	Fe	Ni	Cu	Zn	As	Rb
Bloco	2	4633.92	12873.14	7667.59	18804.14	182.48	2.20	0.39	0.01	0.76	151.39	0.0001	1937.37
Genótipo	8	17786.84*	204298.64*	26224*	79545.87*	497.25*	25.40*	8.05*	0.002^{ns}	0.41^{ns}	142.92^{ns}	0.001*	6243.78*
Resíduo	16	2186.59	20576.43	2475.5	5406	125.02	1.22	1.3	0.003	0.67	69.99	0.0001	595.82
CV (%)		3.71	4.41	5.97	3.34	12.54	5.85	12.48	55.67	95	34	10.97	8

*Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F

^{ns} não significativo

GL: Graus de liberdade. FV: Fonte de variação. CV (%): Coeficiente de variação

Tabela A4. Resumo da ANOVA para as variáveis teores de: magnésio (Mg), fósforo (P), enxofre (S), potássio (K), cálcio (Ca), manganês (Mn), ferro (Fe), níquel (Ni), cobre (Cu), zinco (Zn), arsênio (As), rubídio (Rb) nas sementes de nove genótipos de arroz, na área II do experimento realizado em Minas Gerais.

FV	GL	Quadrado Médio											
		Teor de minerais (mg kg ⁻¹)											
		Mg	P	S	K	Ca	Mn	Fe	Ni	Cu	Zn	As	Rb
Bloco	2	5009.14	133947.37	7275	51844	251.81	5.21	10.36	0.0002	1.83	107	0.0006	2680.48
Genótipo	8	17753.17*	174690*	27598.83*	73981*	242.70*	18.56*	1.87^{ns}	0.06^{ns}	2.30^{ns}	9.12^{ns}	0.0005*	5691.42*
Resíduo	16	3500.52	37196.28	4290.45	9389.91	54.85	1.9	1.14	0.002	0.7	20.34	0.00008	684.31
CV (%)		4.87	6.13	7.83	4.48	8.91	7.35	12	30	39.35	18.6	9.86	9.95

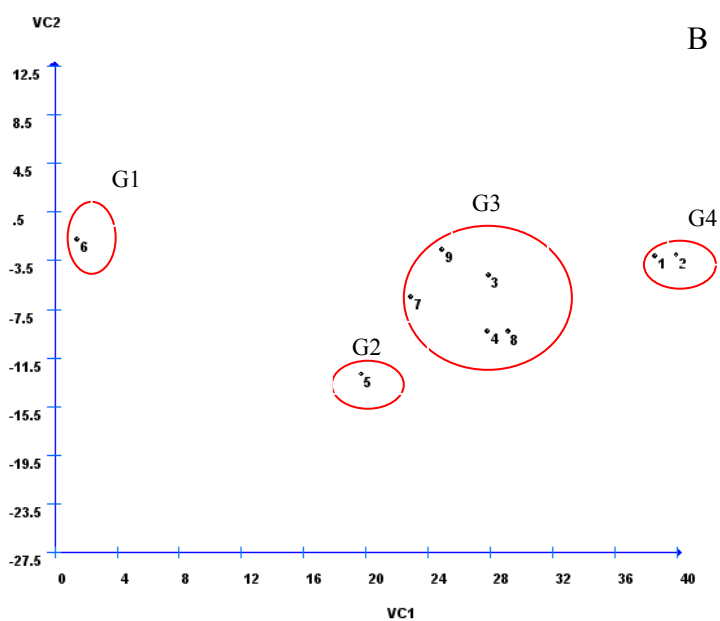
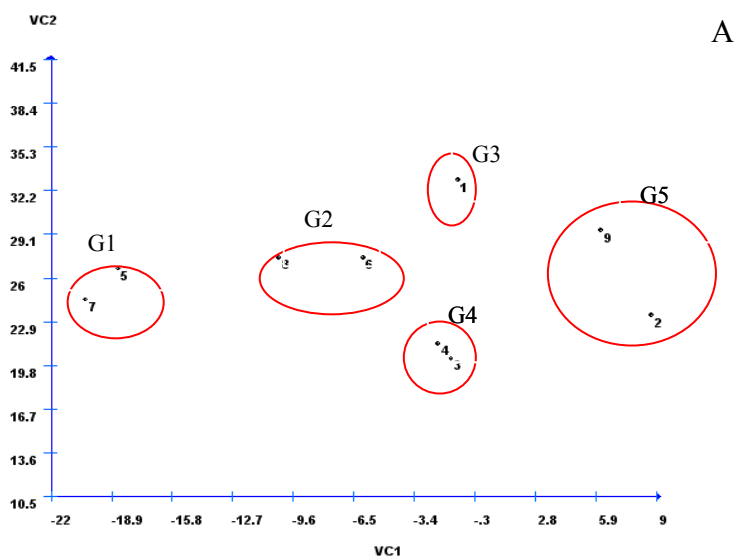
*Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F

^{ns} não significativo

GL: Graus de liberdade. FV: Fonte de variação. CV (%): Coeficiente de variação

Tabela A5. Variáveis Canônicas (VC), autovalores (λ), percentagens da variância e percentagem da variância acumulada obtidas da análise de 12 caracteres de arroz cultivadas sob teores de ferro, na RS (áreas I e II respectivamente) e MG (áreas I e II respectivamente).

Variáveis Canônicas	Autovalores	% Variância	%Variância Acumulada
Área I RS - VC1	99,38	72,76	72,76
Área I RS - VC2	15,94	11,67	84,43
Área II RS - VC1	127,99	80,79	80,79
Área II RS - VC2	14,59	9,21	90
Área I MG-VC1	83,91	59,30	59,30
Área I MG-VC2	22,18	15,67	74,98
Área I MG-VC3	15,09	10,66	85,65
Área II MG-VC1	674,57	85	85,07
Área II MG-VC2	80,89	10,2	95,27



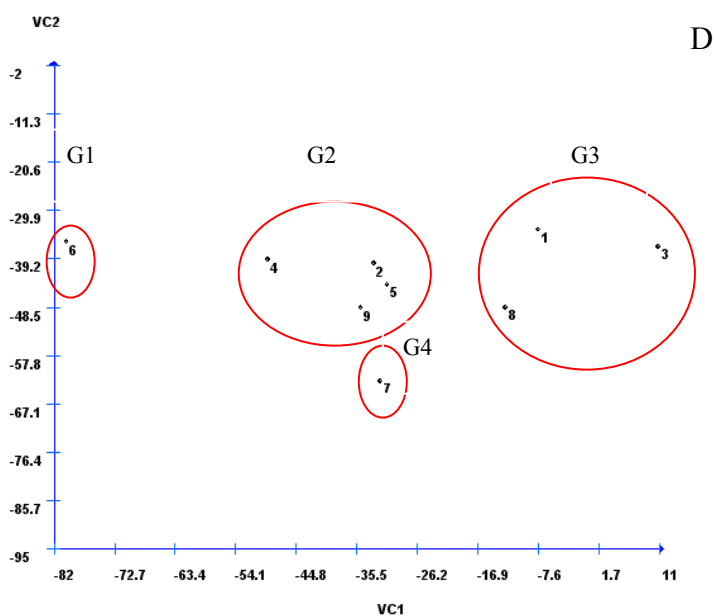
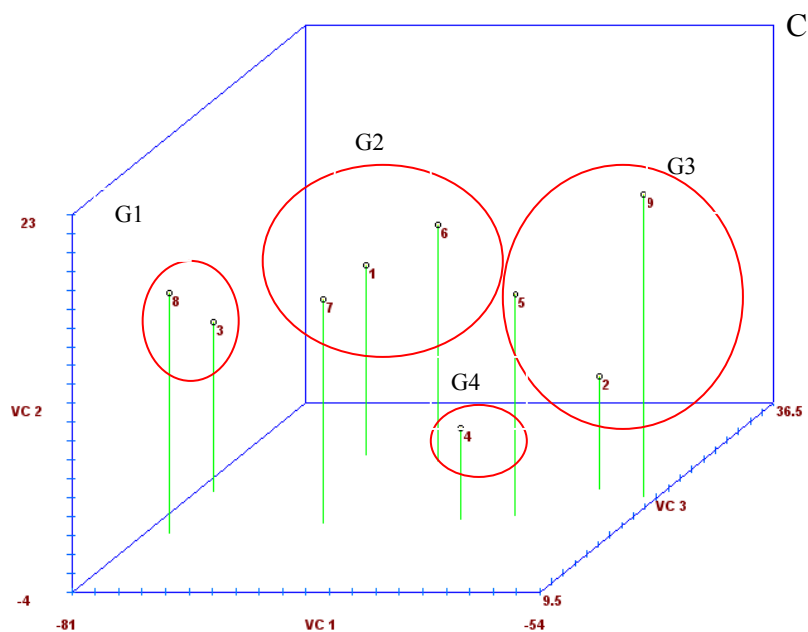


Figura A1. A) Dispersão gráfica dos escores de nove genótipos de arroz em relação as 2 primeiras variáveis canônicas, no experimento realizado no RS, área I. B) Dispersão gráfica dos escores de 9 genótipos de arroz em relação as 2 primeiras variáveis canônicas, no experimento realizado no RS, área II. C) Dispersão gráfica dos escores de 9 genótipos de arroz em relação as 3 primeiras variáveis canônicas, no experimento realizado em MG, área I. D) Dispersão gráfica dos escores de 9 genótipos de arroz em relação as 2 primeiras variáveis canônicas, no experimento realizado em MG, área II.

Genótipos:

- 1-BR IRGA 409
- 2-BR IRGA 410
- 3-IRGA 417
- 4-BRS ATALANTA
- 5-BRA 041255

- 6- BRA 041176
- 7-BRA 041152
- 8-BRA 041171
- 9-BRSMR PREDILETA

Métodos de agrupamentos

Tabela A6. Agrupamento dos genótipos de *Oryza sativa*, pelo método de Tocher, com base nos caracteres quantitativos.

Grupos	RS área I	RS área II	MG área I	MG área II
I	gen 4 e 9	gen 4 e 9	gen 1 e 8	gen 1 e 8
II	gen 1 e 8	gen 1 e 8	gen 4 e 9	gen 4 e 9
III	gen 2 e 3	gen 2 e 3	gen 2,3 e 5	gen 2,3 e 5
IV	gen 5	gen 5	gen 6	gen 6
V	gen 6	gen 6	gen 7	gen 7
VI	gen 7	gen 7		

Genpotipos:

1-BR IRGA 409

2-BR IRGA 410

3-IRGA 417

4-BRS ATALANTA

5-BRA 041255

6- BRA 041176

7-BRA 041152

8-BRA 041171

9-BRSMG PREDILETA

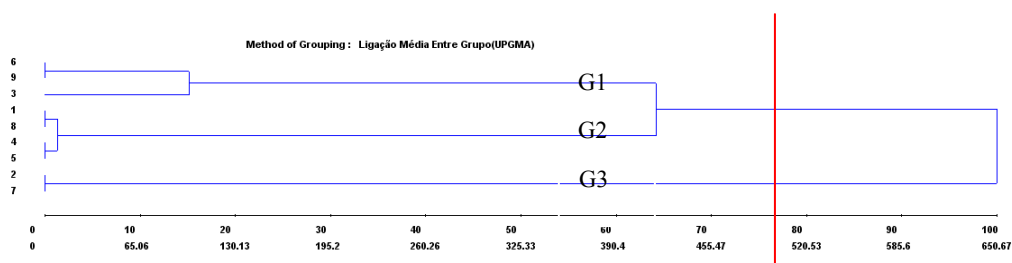


Figura A2 - Dendrograma de dissimilaridade genética entre os 9 genótipos de *Oryza sativa* para o experimento realizado no RS, área I, obtido pelo método UPGMA, com base na matriz de dissimilaridade com dados multicategóricos.

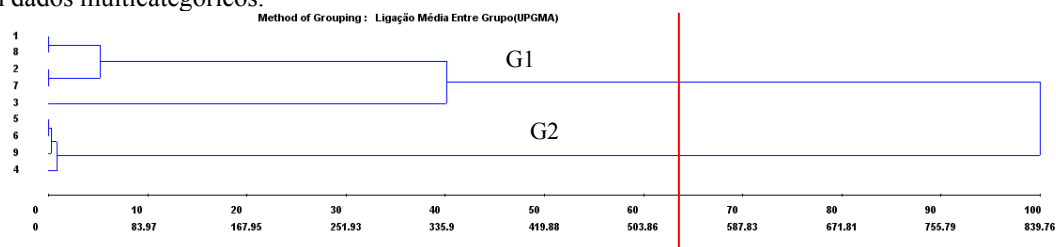


Figura A3 - Dendrograma de dissimilaridade genética entre os 9 genótipos de *Oryza sativa* para o experimento realizado no RS, área II, obtido pelo método UPGMA, com base na matriz de dissimilaridade com dados multicategóricos.

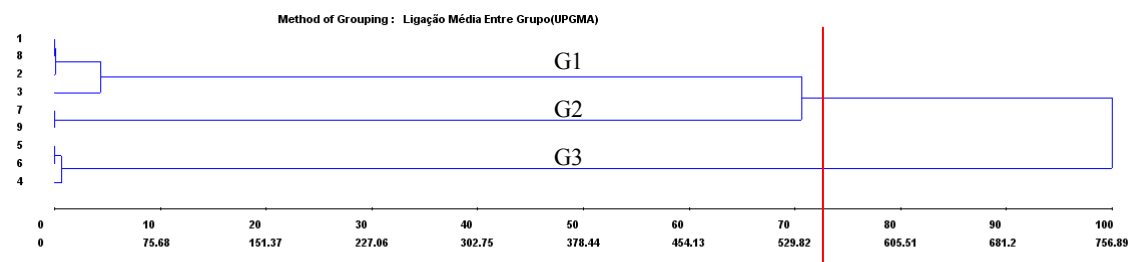


Figura A4 - Dendrograma de dissimilaridade genética entre os 9 genótipos de *Oryza sativa* para o experimento realizado em MG, área I, obtido pelo método UPGMA, com base na matriz de dissimilaridade com dados multicategóricos.

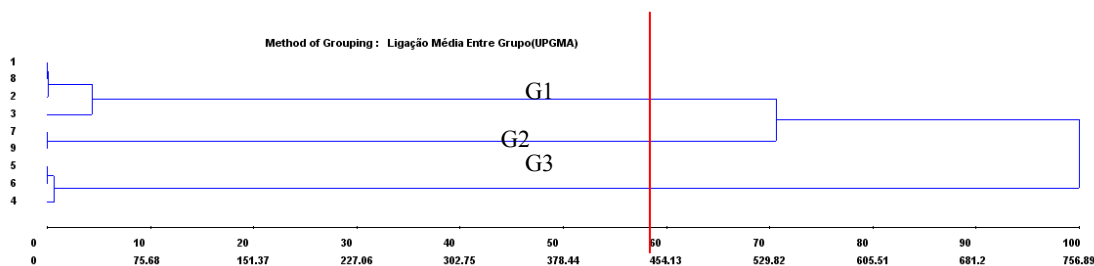


Figura A5 - Dendrograma de dissimilaridade genética entre os 9 genótipos de *Oryza sativa* para o experimento realizado em MG, área II, obtido pelo método UPGMA, com base na matriz de dissimilaridade com dados multicategóricos

Análise de correlação e Análise de trilha

Tabela A7. Análise do coeficiente de correlação de Pearson, para verificar a correlação de todos os minerais, em relação ao mineral Fe, para todos os ambientes e genótipos.

	Mg	P	S	K	Ca	Mn	Co	Ni	Cu	Zn	As	Rb
Fe	0.53**	0.57**	0.51**	0.54**	-0.52**	0.02	-0.02	-0.5**	-0.55**	-0.15	-0.36**	0.57**

** Significativo a 1% de probabilidade pelo teste t.

Tabela A8. Análise de trilha da variável básica Fe com as variáveis explicativas: Mg, P, S, K, Ca, Mn, Co, Ni, Cu, Zn, As e Rb nos dois experimentos MG e RS.

VARIÁVEL =====> Mg

EFEITO DIRETO SOBRE Fe	-.03310931
EFEITO INDIRETO VIA P	.37522494
EFEITO INDIRETO VIA S	.02017301
EFEITO INDIRETO VIA K	-.03348759
EFEITO INDIRETO VIA Ca	.04391788
EFEITO INDIRETO VIA Mn	-.03100561
EFEITO INDIRETO VIA Co	-.03218753
EFEITO INDIRETO VIA Ni	.02643804
EFEITO INDIRETO VIA Cu	.12165135
EFEITO INDIRETO VIA Zn	-.00069111
EFEITO INDIRETO VIA As	-.00528316
EFEITO INDIRETO VIA Rb	.03787558
EFEITO INDIRETO VIA Mo	.04289051
TOTAL	0.532407

VARIÁVEL =====> P

EFEITO DIRETO SOBRE Fe	.39129014
EFEITO INDIRETO VIA Mg	-.03174994
EFEITO INDIRETO VIA S	.02743515
EFEITO INDIRETO VIA K	-.03677662
EFEITO INDIRETO VIA Ca	.04163119
EFEITO INDIRETO VIA Mn	-.03141707
EFEITO INDIRETO VIA Co	-.03771577
EFEITO INDIRETO VIA Ni	.02745777
EFEITO INDIRETO VIA Cu	.12967757
EFEITO INDIRETO VIA Zn	-.00020054
EFEITO INDIRETO VIA As	-.0059874
EFEITO INDIRETO VIA Rb	.0415436
EFEITO INDIRETO VIA Mo	.06127794
TOTAL	0.576466

VARIÁVEL =====> S

EFEITO DIRETO SOBRE	Fe	-.09037682	
EFEITO INDIRETO VIA	Mg	.00739033	
EFEITO INDIRETO VIA	P	-.1187816	
EFEITO INDIRETO VIA	K	.01186914	
EFEITO INDIRETO VIA	Ca	-.06979953	
EFEITO INDIRETO VIA	Mn	.02479349	
EFEITO INDIRETO VIA	Co	.01489584	
EFEITO INDIRETO VIA	Ni	-.07896803	
EFEITO INDIRETO VIA	Cu	-.12177723	
EFEITO INDIRETO VIA	Zn	.00238263	
EFEITO INDIRETO VIA	As	.00865384	
EFEITO INDIRETO VIA	Rb	-.03389393	
EFEITO INDIRETO VIA	Mo	-.07251112	
TOTAL			-0.516123

VARIÁVEL =====> K

EFEITO DIRETO SOBRE	Fe	-.03950979	
EFEITO INDIRETO VIA	Mg	-.02806269	
EFEITO INDIRETO VIA	P	.36422187	
EFEITO INDIRETO VIA	S	.0271501	
EFEITO INDIRETO VIA	Ca	.02602161	
EFEITO INDIRETO VIA	Mn	-.02321825	
EFEITO INDIRETO VIA	Co	-.03437546	
EFEITO INDIRETO VIA	Ni	.03242342	
EFEITO INDIRETO VIA	Cu	.11033292	
EFEITO INDIRETO VIA	Zn	.00069203	
EFEITO INDIRETO VIA	As	-.00448335	
EFEITO INDIRETO VIA	Rb	.04116584	
EFEITO INDIRETO VIA	Mo	.06816776	
TOTAL			0.540526

VARIÁVEL =====> Ca

EFEITO DIRETO SOBRE	Fe	-.11133953	
EFEITO INDIRETO VIA	Mg	.01305997	
EFEITO INDIRETO VIA	P	-.14630808	
EFEITO INDIRETO VIA	S	-.05665786	
EFEITO INDIRETO VIA	K	.00923399	
EFEITO INDIRETO VIA	Mn	.01867214	
EFEITO INDIRETO VIA	Co	.0116455	
EFEITO INDIRETO VIA	Ni	-.06352211	
EFEITO INDIRETO VIA	Cu	-.12781451	
EFEITO INDIRETO VIA	Zn	.00404312	
EFEITO INDIRETO VIA	As	.00862515	
EFEITO INDIRETO VIA	Rb	-.02832767	
EFEITO INDIRETO VIA	Mo	-.06089511	
TOTAL			-0.529585

VARIÁVEL =====> Mn

EFEITO DIRETO SOBRE	Fe	.13710864	
EFEITO INDIRETO VIA	Mg	.00748731	
EFEITO INDIRETO VIA	P	-.08966022	
EFEITO INDIRETO VIA	S	-.01634293	
EFEITO INDIRETO VIA	K	.00669067	
EFEITO INDIRETO VIA	Ca	-.01516277	
EFEITO INDIRETO VIA	Co	.07888413	
EFEITO INDIRETO VIA	Ni	-.00821883	
EFEITO INDIRETO VIA	Cu	-.09507118	
EFEITO INDIRETO VIA	Zn	.00067875	
EFEITO INDIRETO VIA	As	.00077406	
EFEITO INDIRETO VIA	Rb	-.01694316	
EFEITO INDIRETO VIA	Mo	.03204054	
TOTAL			0.022265

VARIÁVEL =====> Co

EFEITO DIRETO SOBRE	Fe	.12324972	
EFEITO INDIRETO VIA	Mg	.00864673	
EFEITO INDIRETO VIA	P	-.11973909	
EFEITO INDIRETO VIA	S	-.01092285	

EFEITO INDIRETO VIA K	.01101964	
EFEITO INDIRETO VIA Ca	-.01052014	
EFEITO INDIRETO VIA Mn	.08775433	
EFEITO INDIRETO VIA Ni	.00121441	
EFEITO INDIRETO VIA Cu	-.10342693	
EFEITO INDIRETO VIA Zn	.00024113	
EFEITO INDIRETO VIA As	.00144638	
EFEITO INDIRETO VIA Rb	-.01957111	
EFEITO INDIRETO VIA Mo	.00835079	
TOTAL		-0.022257

VARIÁVEL =====> Ni

EFEITO DIRETO SOBRE Fe	-.1365277	
EFEITO INDIRETO VIA Mg	.00641149	
EFEITO INDIRETO VIA P	-.07869432	
EFEITO INDIRETO VIA S	-.05227423	
EFEITO INDIRETO VIA K	.00938302	
EFEITO INDIRETO VIA Ca	-.05180283	
EFEITO INDIRETO VIA Mn	.0082538	
EFEITO INDIRETO VIA Co	-.00109631	
EFEITO INDIRETO VIA Cu	-.09585678	
EFEITO INDIRETO VIA Zn	.000949	
EFEITO INDIRETO VIA As	.00271742	
EFEITO INDIRETO VIA Rb	-.02061016	
EFEITO INDIRETO VIA Mo	-.09290841	
TOTAL		-0.502056

VARIÁVEL =====> Cu

EFEITO DIRETO SOBRE Fe	-.22160856	
EFEITO INDIRETO VIA Mg	.01817526	
EFEITO INDIRETO VIA P	-.2289693	
EFEITO INDIRETO VIA S	-.04966342	
EFEITO INDIRETO VIA K	.01967086	
EFEITO INDIRETO VIA Ca	-.06421596	
EFEITO INDIRETO VIA Mn	.05882029	
EFEITO INDIRETO VIA Co	.05752188	
EFEITO INDIRETO VIA Ni	-.05905506	
EFEITO INDIRETO VIA Zn	.00194838	
EFEITO INDIRETO VIA As	.00640739	
EFEITO INDIRETO VIA Rb	-.03569368	
EFEITO INDIRETO VIA Mo	-.05817708	
TOTAL		-0.554839

VARIÁVEL =====> Zn

EFEITO DIRETO SOBRE Fe	.00729223	
EFEITO INDIRETO VIA Mg	.0031379	
EFEITO INDIRETO VIA P	-.01076087	
EFEITO INDIRETO VIA S	-.02952927	
EFEITO INDIRETO VIA K	-.00374944	
EFEITO INDIRETO VIA Ca	-.06173131	
EFEITO INDIRETO VIA Mn	.01276194	
EFEITO INDIRETO VIA Co	.0040755	
EFEITO INDIRETO VIA Ni	-.01776758	
EFEITO INDIRETO VIA Cu	-.0592107	
EFEITO INDIRETO VIA As	.00312096	
EFEITO INDIRETO VIA Rb	-.00641058	
EFEITO INDIRETO VIA Mo	.00526922	
TOTAL		-0.153502

VARIÁVEL =====> As

EFEITO DIRETO SOBRE Fe	.01593767	
EFEITO INDIRETO VIA Mg	.01097537	
EFEITO INDIRETO VIA P	-.14699832	
EFEITO INDIRETO VIA S	-.04907281	
EFEITO INDIRETO VIA K	.0111143	
EFEITO INDIRETO VIA Ca	-.06025473	
EFEITO INDIRETO VIA Mn	.00665909	
EFEITO INDIRETO VIA Co	.01118516	
EFEITO INDIRETO VIA Ni	-.02327838	
EFEITO INDIRETO VIA Cu	-.08909284	
EFEITO INDIRETO VIA Zn	.00142799	
EFEITO INDIRETO VIA Rb	-.02663222	

EFEITO INDIRETO VIA Mo	- .03031629	
TOTAL		-0.368346

VARIÁVEL =====> Rb

EFEITO DIRETO SOBRE Fe	.0563478	
EFEITO INDIRETO VIA Mg	-.02225525	
EFEITO INDIRETO VIA P	.28848688	
EFEITO INDIRETO VIA S	.05436283	
EFEITO INDIRETO VIA K	-.02886455	
EFEITO INDIRETO VIA Ca	.05597361	
EFEITO INDIRETO VIA Mn	-.04122706	
EFEITO INDIRETO VIA Co	-.04280795	
EFEITO INDIRETO VIA Ni	.04993733	
EFEITO INDIRETO VIA Cu	.1403786	
EFEITO INDIRETO VIA Zn	-.00082962	
EFEITO INDIRETO VIA As	-.00753278	
EFEITO INDIRETO VIA Mo	.06826517	
TOTAL		0.570235

COEFICIENTE DE DETERMINAÇÃO ==> .61251857
 EFEITO DA VARIÁVEL RESIDUAL : .62248006

Tabela A9. Análise de trilha da variável básica Fe com as variáveis explicativas: Mg, P, S, K, Ca, Mn, Co, Ni, Cu, Zn, As e Rb do experimento MG.

VARIÁVEL =====> Mg

EFEITO DIRETO SOBRE Fe	-.18826578	
EFEITO INDIRETO VIA P	.3940959	
EFEITO INDIRETO VIA S	.32485259	
EFEITO INDIRETO VIA K	-.07083703	
EFEITO INDIRETO VIA Ca	-.00531248	
EFEITO INDIRETO VIA Mn	-.11649333	
EFEITO INDIRETO VIA Co	.00780936	
EFEITO INDIRETO VIA Cu	.01264072	
EFEITO INDIRETO VIA Zn	.05276078	
EFEITO INDIRETO VIA Ni	.00934566	
EFEITO INDIRETO VIA As	-.01997013	
EFEITO INDIRETO VIA Rb	-.0023188	
EFEITO INDIRETO VIA Mo	.00218852	
TOTAL		0.400496

VARIÁVEL =====> P

EFEITO DIRETO SOBRE Fe	.47378115	
EFEITO INDIRETO VIA Mg	-.15660136	
EFEITO INDIRETO VIA S	.29256977	
EFEITO INDIRETO VIA K	-.10768919	
EFEITO INDIRETO VIA Ca	.05806641	
EFEITO INDIRETO VIA Mn	-.14156568	
EFEITO INDIRETO VIA Co	.00243809	
EFEITO INDIRETO VIA Cu	.02083875	
EFEITO INDIRETO VIA Zn	.06768504	
EFEITO INDIRETO VIA Ni	.01740845	
EFEITO INDIRETO VIA As	-.03971189	
EFEITO INDIRETO VIA Rb	-.00737243	
EFEITO INDIRETO VIA Mo	.00567189	
TOTAL		0.485519

VARIÁVEL =====> S

EFEITO DIRETO SOBRE Fe	.42591721	
EFEITO INDIRETO VIA Mg	-.14359276	
EFEITO INDIRETO VIA P	.32544833	
EFEITO INDIRETO VIA K	-.06781597	
EFEITO INDIRETO VIA Ca	-.01108736	
EFEITO INDIRETO VIA Mn	-.10697979	
EFEITO INDIRETO VIA Co	.01542309	
EFEITO INDIRETO VIA Cu	.01574695	
EFEITO INDIRETO VIA Zn	.04962765	

EFEITO INDIRETO VIA Ni	.00778181	
EFEITO INDIRETO VIA As	-.00127179	
EFEITO INDIRETO VIA Rb	-.00041986	
EFEITO INDIRETO VIA Mo	.00424849	
TOTAL		0.513026

VARIÁVEL =====> K

EFEITO DIRETO SOBRE Fe	-.12311262	
EFEITO INDIRETO VIA Mg	-.10832512	
EFEITO INDIRETO VIA P	.41442632	
EFEITO INDIRETO VIA S	.23461437	
EFEITO INDIRETO VIA Ca	.10572222	
EFEITO INDIRETO VIA Mn	-.13985746	
EFEITO INDIRETO VIA Co	-.0048447	
EFEITO INDIRETO VIA Cu	.02301462	
EFEITO INDIRETO VIA Zn	.06238899	
EFEITO INDIRETO VIA Ni	.01874648	
EFEITO INDIRETO VIA As	-.0412207	
EFEITO INDIRETO VIA Rb	-.01611459	
EFEITO INDIRETO VIA Mo	.00602518	
TOTAL		0.431463

VARIÁVEL =====> Ca

EFEITO DIRETO SOBRE Fe	.4162079	
EFEITO INDIRETO VIA Mg	.00240302	
EFEITO INDIRETO VIA P	.06609863	
EFEITO INDIRETO VIA S	-.01134601	
EFEITO INDIRETO VIA K	-.03127221	
EFEITO INDIRETO VIA Mn	-.08949317	
EFEITO INDIRETO VIA Co	.00710658	
EFEITO INDIRETO VIA Cu	.0093579	
EFEITO INDIRETO VIA Zn	-.00490376	
EFEITO INDIRETO VIA Ni	.01204111	
EFEITO INDIRETO VIA As	-.0088746	
EFEITO INDIRETO VIA Rb	-.00650267	
EFEITO INDIRETO VIA Mo	.00084527	
TOTAL		0.361668

VARIÁVEL =====> Mn

EFEITO DIRETO SOBRE Fe	-.22730849	
EFEITO INDIRETO VIA Mg	-.09648433	
EFEITO INDIRETO VIA P	.29506664	
EFEITO INDIRETO VIA S	.2004524	
EFEITO INDIRETO VIA K	-.07574824	
EFEITO INDIRETO VIA Ca	.16386438	
EFEITO INDIRETO VIA Co	.0099645	
EFEITO INDIRETO VIA Cu	.09603036	
EFEITO INDIRETO VIA Zn	-.00235153	
EFEITO INDIRETO VIA Ni	.01257894	
EFEITO INDIRETO VIA As	-.01051467	
EFEITO INDIRETO VIA Rb	-.01146893	
EFEITO INDIRETO VIA Mo	.00515599	
TOTAL		0.359237

VARIÁVEL =====> Co

EFEITO DIRETO SOBRE Fe	.07475578	
EFEITO INDIRETO VIA Mg	-.01966718	
EFEITO INDIRETO VIA P	.0154519	
EFEITO INDIRETO VIA S	.08787226	
EFEITO INDIRETO VIA K	.00797856	
EFEITO INDIRETO VIA Ca	.03956639	
EFEITO INDIRETO VIA Mn	-.03029886	
EFEITO INDIRETO VIA Cu	.04670674	
EFEITO INDIRETO VIA Zn	-.07298723	
EFEITO INDIRETO VIA Ni	-.00053989	
EFEITO INDIRETO VIA As	.02338541	
EFEITO INDIRETO VIA Rb	.01033406	
EFEITO INDIRETO VIA Mo	-.00048294	
TOTAL		0.182075

VARIÁVEL =====> Cu

EFEITO DIRETO SOBRE	Fe	.24058774	
EFEITO INDIRETO VIA	Mg	-.00989167	
EFEITO INDIRETO VIA	P	.04103703	
EFEITO INDIRETO VIA	S	.02787713	
EFEITO INDIRETO VIA	K	-.01177695	
EFEITO INDIRETO VIA	Ca	.01618882	
EFEITO INDIRETO VIA	Mn	-.09072996	
EFEITO INDIRETO VIA	Co	.01451279	
EFEITO INDIRETO VIA	Zn	-.04231357	
EFEITO INDIRETO VIA	Ni	.00094524	
EFEITO INDIRETO VIA	As	.01191431	
EFEITO INDIRETO VIA	Rb	-.00316967	
EFEITO INDIRETO VIA	Mo	.00080275	
TOTAL			0.195984

VARIÁVEL =====> Zn

EFEITO DIRETO SOBRE	Fe	-.19792395	
EFEITO INDIRETO VIA	Mg	.0501862	
EFEITO INDIRETO VIA	P	-.16202131	
EFEITO INDIRETO VIA	S	-.10679491	
EFEITO INDIRETO VIA	K	.03880719	
EFEITO INDIRETO VIA	Ca	.01031197	
EFEITO INDIRETO VIA	Mn	-.00270065	
EFEITO INDIRETO VIA	Co	.02756724	
EFEITO INDIRETO VIA	Cu	.05143453	
EFEITO INDIRETO VIA	Ni	-.00184667	
EFEITO INDIRETO VIA	As	.016328	
EFEITO INDIRETO VIA	Rb	.00369276	
EFEITO INDIRETO VIA	Mo	-.0038804	
TOTAL			-0.27684

VARIÁVEL =====> Ni

EFEITO DIRETO SOBRE	Fe	.03751862	
EFEITO INDIRETO VIA	Mg	-.04689588	
EFEITO INDIRETO VIA	P	.21983208	
EFEITO INDIRETO VIA	S	.08834034	
EFEITO INDIRETO VIA	K	-.0615142	
EFEITO INDIRETO VIA	Ca	.13357652	
EFEITO INDIRETO VIA	Mn	-.07621017	
EFEITO INDIRETO VIA	Co	-.00107574	
EFEITO INDIRETO VIA	Cu	.00606137	
EFEITO INDIRETO VIA	Zn	.00974182	
EFEITO INDIRETO VIA	As	-.03762382	
EFEITO INDIRETO VIA	Rb	-.00391779	
EFEITO INDIRETO VIA	Mo	.00296586	
TOTAL			0.270799

VARIÁVEL =====> As

EFEITO DIRETO SOBRE	Fe	-.07591876	
EFEITO INDIRETO VIA	Mg	-.04952256	
EFEITO INDIRETO VIA	P	.24782734	
EFEITO INDIRETO VIA	S	.00713497	
EFEITO INDIRETO VIA	K	-.06684498	
EFEITO INDIRETO VIA	Ca	.04865304	
EFEITO INDIRETO VIA	Mn	-.031482	
EFEITO INDIRETO VIA	Co	-.02302717	
EFEITO INDIRETO VIA	Cu	-.03775664	
EFEITO INDIRETO VIA	Zn	.0425679	
EFEITO INDIRETO VIA	Ni	.01859348	
EFEITO INDIRETO VIA	Rb	-.0104036	
EFEITO INDIRETO VIA	Mo	.00199899	
TOTAL			0.07182

VARIÁVEL =====> Rb

EFEITO DIRETO SOBRE	Fe	-.04403844	
EFEITO INDIRETO VIA	Mg	-.00991295	
EFEITO INDIRETO VIA	P	.07931523	
EFEITO INDIRETO VIA	S	.00406069	
EFEITO INDIRETO VIA	K	-.04504949	
EFEITO INDIRETO VIA	Ca	.06145684	
EFEITO INDIRETO VIA	Mn	-.05919795	

EFEITO INDIRETO VIA	Co	- .01754219	
EFEITO INDIRETO VIA	Cu	.0173163	
EFEITO INDIRETO VIA	Zn	.01659652	
EFEITO INDIRETO VIA	Ni	.00333777	
EFEITO INDIRETO VIA	As	-.01793497	
EFEITO INDIRETO VIA	Mo	-.00148436	
TOTAL			-0.013077

COEFICIENTE DE DETERMINAÇÃO ==> .51337301
 EFEITO DA VARIÁVEL RESIDUAL : .69758655

Tabela A10. Análise de trilha da variável básica Fe com as variáveis explicativas: Mg, P, S, K, Ca, Mn, Co, Ni, Cu, Zn, As e Rb do experimento RS.

VARIÁVEL ==> Mg

EFEITO DIRETO SOBRE	Fe	-.11851873	
EFEITO INDIRETO VIA	P	.8370423	
EFEITO INDIRETO VIA	S	.01467565	
EFEITO INDIRETO VIA	K	-.37676379	
EFEITO INDIRETO VIA	Ca	.0108359	
EFEITO INDIRETO VIA	Mn	-.1319816	
EFEITO INDIRETO VIA	Co	.07720623	
EFEITO INDIRETO VIA	Cu	-.02043391	
EFEITO INDIRETO VIA	Zn	.03630607	
EFEITO INDIRETO VIA	Ni	.00667525	
EFEITO INDIRETO VIA	As	-.02778351	
EFEITO INDIRETO VIA	Rb	.06668371	
EFEITO INDIRETO VIA	Mo	-.01334157	
TOTAL			0.360602

VARIÁVEL ==> P

EFEITO DIRETO SOBRE	Fe	.86340286	
EFEITO INDIRETO VIA	Mg	-.11490024	
EFEITO INDIRETO VIA	S	.00899774	
EFEITO INDIRETO VIA	K	-.40585015	
EFEITO INDIRETO VIA	Ca	.0049908	
EFEITO INDIRETO VIA	Mn	-.14871366	
EFEITO INDIRETO VIA	Co	.09059436	
EFEITO INDIRETO VIA	Cu	-.02670292	
EFEITO INDIRETO VIA	Zn	.03637048	
EFEITO INDIRETO VIA	Ni	.00102417	
EFEITO INDIRETO VIA	As	-.03562382	
EFEITO INDIRETO VIA	Rb	.07150488	
EFEITO INDIRETO VIA	Mo	-.01222851	
TOTAL			0.332866

VARIÁVEL ==> S

EFEITO DIRETO SOBRE	Fe	.08211719	
EFEITO INDIRETO VIA	Mg	-.02118119	
EFEITO INDIRETO VIA	P	.09460478	
EFEITO INDIRETO VIA	K	-.07782929	
EFEITO INDIRETO VIA	Ca	-.01235001	
EFEITO INDIRETO VIA	Mn	.06170053	
EFEITO INDIRETO VIA	Co	-.02741424	
EFEITO INDIRETO VIA	Cu	.0127873	
EFEITO INDIRETO VIA	Zn	-.02633816	
EFEITO INDIRETO VIA	Ni	-.03417785	
EFEITO INDIRETO VIA	As	.05102461	
EFEITO INDIRETO VIA	Rb	-.01059554	
EFEITO INDIRETO VIA	Mo	.01666887	
TOTAL			0.109017

VARIÁVEL ==> K

EFEITO DIRETO SOBRE	Fe	-.44423615	
EFEITO INDIRETO VIA	Mg	-.10051763	
EFEITO INDIRETO VIA	P	.78879708	
EFEITO INDIRETO VIA	S	.01438677	

EFEITO INDIRETO VIA	Ca	-.01353808	
EFEITO INDIRETO VIA	Mn	-.12195175	
EFEITO INDIRETO VIA	Co	.07766885	
EFEITO INDIRETO VIA	Cu	-.02172857	
EFEITO INDIRETO VIA	Zn	.02271393	
EFEITO INDIRETO VIA	Ni	-.01626561	
EFEITO INDIRETO VIA	As	-.00885543	
EFEITO INDIRETO VIA	Rb	.06354032	
EFEITO INDIRETO VIA	Mo	-.00827972	
TOTAL			0.231734

VARIÁVEL =====> Ca

EFEITO DIRETO SOBRE	Fe	-.07150141	
EFEITO INDIRETO VIA	Mg	.01796128	
EFEITO INDIRETO VIA	P	-.06026552	
EFEITO INDIRETO VIA	S	.01418361	
EFEITO INDIRETO VIA	K	-.08411167	
EFEITO INDIRETO VIA	Mn	.03044719	
EFEITO INDIRETO VIA	Co	-.01944311	
EFEITO INDIRETO VIA	Cu	.01036426	
EFEITO INDIRETO VIA	Zn	-.03020261	
EFEITO INDIRETO VIA	Ni	-.06730725	
EFEITO INDIRETO VIA	As	.05675193	
EFEITO INDIRETO VIA	Rb	-.0100076	
EFEITO INDIRETO VIA	Mo	.01976291	
TOTAL			-0.193368

VARIÁVEL =====> Mn

EFEITO DIRETO SOBRE	Fe	.38169683	
EFEITO INDIRETO VIA	Mg	.04098093	
EFEITO INDIRETO VIA	P	-.33639211	
EFEITO INDIRETO VIA	S	.01327408	
EFEITO INDIRETO VIA	K	.14193301	
EFEITO INDIRETO VIA	Ca	-.00570352	
EFEITO INDIRETO VIA	Co	-.1640735	
EFEITO INDIRETO VIA	Cu	.00862767	
EFEITO INDIRETO VIA	Zn	-.05217259	
EFEITO INDIRETO VIA	Ni	-.00153072	
EFEITO INDIRETO VIA	As	.00231843	
EFEITO INDIRETO VIA	Rb	-.0522564	
EFEITO INDIRETO VIA	Mo	.0210679	
TOTAL			-0.00223

VARIÁVEL =====> Co

EFEITO DIRETO SOBRE	Fe	-.20272456	
EFEITO INDIRETO VIA	Mg	.04513703	
EFEITO INDIRETO VIA	P	-.38584092	
EFEITO INDIRETO VIA	S	.01110462	
EFEITO INDIRETO VIA	K	.17019798	
EFEITO INDIRETO VIA	Ca	-.00685763	
EFEITO INDIRETO VIA	Mn	.30892327	
EFEITO INDIRETO VIA	Cu	.0143579	
EFEITO INDIRETO VIA	Zn	-.05197835	
EFEITO INDIRETO VIA	Ni	-.00430092	
EFEITO INDIRETO VIA	As	.02379654	
EFEITO INDIRETO VIA	Rb	-.04930937	
EFEITO INDIRETO VIA	Mo	.01639742	
TOTAL			-0.111097

VARIÁVEL =====> Cu

EFEITO DIRETO SOBRE	Fe	-.06998153	
EFEITO INDIRETO VIA	Mg	-.03460628	
EFEITO INDIRETO VIA	P	.32944949	
EFEITO INDIRETO VIA	S	-.01500478	
EFEITO INDIRETO VIA	K	-.13793088	
EFEITO INDIRETO VIA	Ca	.01058936	
EFEITO INDIRETO VIA	Mn	-.04705749	
EFEITO INDIRETO VIA	Co	.04159239	
EFEITO INDIRETO VIA	Zn	.01006013	
EFEITO INDIRETO VIA	Ni	.00494664	
EFEITO INDIRETO VIA	As	-.09001816	
EFEITO INDIRETO VIA	Rb	.03813454	

EFEITO INDIRETO VIA Mo -.02473342
TOTAL 0.01544

VARIÁVEL =====> Zn

EFEITO DIRETO SOBRE Fe -.08226792
EFEITO INDIRETO VIA Mg .05230409
EFEITO INDIRETO VIA P -.38170868
EFEITO INDIRETO VIA S .0262899
EFEITO INDIRETO VIA K .12265227
EFEITO INDIRETO VIA Ca -.02624996
EFEITO INDIRETO VIA Mn .24206411
EFEITO INDIRETO VIA Co -.12808503
EFEITO INDIRETO VIA Cu .00855769
EFEITO INDIRETO VIA Ni -.02874711
EFEITO INDIRETO VIA As .03308901
EFEITO INDIRETO VIA Rb -.04874183
EFEITO INDIRETO VIA Mo .02921046
TOTAL -0.181633

VARIÁVEL =====> Ni

EFEITO DIRETO SOBRE Fe -.10070523
EFEITO INDIRETO VIA Mg .00785601
EFEITO INDIRETO VIA P -.00878081
EFEITO INDIRETO VIA S .02786934
EFEITO INDIRETO VIA K -.07175169
EFEITO INDIRETO VIA Ca -.04778861
EFEITO INDIRETO VIA Mn .00580179
EFEITO INDIRETO VIA Co -.00865796
EFEITO INDIRETO VIA Cu .00343749
EFEITO INDIRETO VIA Zn -.02348404
EFEITO INDIRETO VIA As .0168663
EFEITO INDIRETO VIA Rb .00042929
EFEITO INDIRETO VIA Mo .01573611
TOTAL -0.183172

VARIÁVEL =====> As

EFEITO DIRETO SOBRE Fe .18557844
EFEITO INDIRETO VIA Mg .01774379
EFEITO INDIRETO VIA P -.16573968
EFEITO INDIRETO VIA S .02257804
EFEITO INDIRETO VIA K .02119806
EFEITO INDIRETO VIA Ca -.02186592
EFEITO INDIRETO VIA Mn .00476854
EFEITO INDIRETO VIA Co -.02599517
EFEITO INDIRETO VIA Cu .0339458
EFEITO INDIRETO VIA Zn -.01466854
EFEITO INDIRETO VIA Ni -.0091526
EFEITO INDIRETO VIA Rb -.02232492
EFEITO INDIRETO VIA Mo .02842714
TOTAL 0.054493

VARIÁVEL =====> Rb

EFEITO DIRETO SOBRE Fe .08833227
EFEITO INDIRETO VIA Mg -.08947204
EFEITO INDIRETO VIA P .69892375
EFEITO INDIRETO VIA S -.00985004
EFEITO INDIRETO VIA K -.31955372
EFEITO INDIRETO VIA Ca .00810075
EFEITO INDIRETO VIA Mn -.22580764
EFEITO INDIRETO VIA Co .11316612
EFEITO INDIRETO VIA Cu -.03021222
EFEITO INDIRETO VIA Zn .04539552
EFEITO INDIRETO VIA Ni -.00048943
EFEITO INDIRETO VIA As -.04690272
EFEITO INDIRETO VIA Mo -.0043876
TOTAL 0.227243

COEFICIENTE DE DETERMINAÇÃO ==> .25973548
EFEITO DA VARIÁVEL RESIDUAL : .86038626

Referências Bibliográficas

Alloway B J (1990) Heavy metals in soils. New York: John Wiley & Sons. p339.

Anderson R C, Menges E S (1977) Effects of fire on sandhill herbs: nutrients, mycorrhizae and biomass allocation. *American Journal of Botany*. 84:938-948.

Angel R, Tamim N M, Applegate T J, Dhandu A S, Ellestad L E (2002) Phytic Acid Chemistry: Influence on phytin-phosphorus availability and phytase efficacy. *Journal of Poultry Science*. 11:471-480.

Asano T, Kunieda N, Omura Y, Ibe H, Kawasaki T, Takano M, Sato M, Furuhashi H, Mujin T, Takaiwa F, Wu C, Tada Y, Satozawa T, Sakamoto M, Shimada H (2002) Rice SPK, a calmodulin-like domain protein kinase, is required for storage product accumulation during seed development: phosphorylation of sucrose synthase is a possible factor. *Plant Cell*. 14:619-628.

Autran J C, Halford G N, Shewry P R (2001) The biochemistry and molecular biology of seed storage protein. *Plant Nitrogen*. p343.

Bay S, Choudhuri M (1981) Mobilization of metabolites from leaves to grains as the cause of monocarpic senescence in rice. *Plant Physiology*. 68:1345-1348.

Bárceñas-Chávez A T, Valdez-Alarcón J J, Martínez-Trujillo M, Chen L, Xoconostle-Cazares B, Lucas W J, Herrera-Estrella L (2000) Tissue-Specific and development pattern of expression of the rice *sps1* gene. *Plant Physiology*. 124: 641-653.

Biswas A K, Choudhuri M A (1980) Mechanism of monocarpic senescence in rice *Plant Physiology*. 65:340-345.

Bouis E H (2003) Micronutrient fortification of plants through plant breeding: can it improve nutrition in man at low cost. *Proceeding of the Nutrition Society*. 62:403-411.

Clarkson D T, Hanson J B (1980) The mineral nutritional of higher plants. *Annual Review of Plant Physiology*. 31:239-289.

Counce P A, Keisling T C, Mitchell A J (2000) A uniform, objective, and adaptive system for expressing rice development. *Crop Science*. 40:436-443.

Cruz C.D, Regazzi A.J, Carneiro S C P (2004) Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético. Viçosa. UFV. p480.

Cruz CD (2006) Programa Genes: Versão Windows - Biometria. Editora UFV, Viçosa. p381.

Curie C, Briat Jean-François (2003) Iron transport and signaling in plants. *Annual Review of Plant Biology*. 54:183-206.

Evans H J, Sorger G J (1966) Role of mineral elements with emphasis on the univalent cations. *Annual Review of Plant Physiology*. 17:47-76.

Fageria N K (1984) Adubação e nutrição mineral da cultura de arroz. EMBRAPA-CNPAP. p341.

Faure G (1998) Principle and application of geochemistry. 2nd edition. p600.

Feil B, Moser S B, Jampatong S, Stamp P (2005) Mineral composition of the grains of tropical maize varieties as affected by pre-anthesis drought and rate of nitrogen fertilization. *Crop Science*. 45:516-523.

Frossard E, Bucher M, Machler F, Mozafar A, Hurrell R (2000) Potential for increasing the content and bioavailability of Fe, Zn and Ca in plants for human nutrition. *Journal of the agriculture food science*. 80:861-879.

Ghosh S N, Kar A K, Ohua S P (1975) Studies on Eh, pH and available phosphorus, iron and manganese in saturated and submerged soils. *Fertility Technology*. 12:360-363.

Gilbert S M, Clarkson D T, Cambridge M, Lambers H, Hawkesford M J (1997) SO_4^{2-} Deprivation has an early effect on the content of ribulose-1,5 biphosphate carboxylase/oxygenase and photosynthesis in young leaves of wheat. *Plant Physiology*. 115:1231-1239.

Goedert W J, Patella J F, Moraes J F V (1971) Formas de fósforo num planossolo do Rio Grande do Sul e sua disponibilidade para a cultura de arroz irrigado. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 6:39-43.

Gotto F, Yoshihara T, Shigenoto N, Tuki S, Takaiwa F (1999) Iron fortification of rice seeds by the soybean ferritin gene. *Nature Biotechnology*. 17: 282-286.

Graff E V D, Schwacke R, Scheneider A, Desimone M, Flugge U F, Kunze R (2006) Transcription analysis of *Arabidopsis* membrane transporters and hormone pathways during development and induced leaf senescence. *Plant Physiology*. 141:776-792.

Graham R, Senadhira D, Beebe S, Iglesias C, Monasterio I (1999) Breeding for micronutrient density in edible portion of staple foods: conventional approaches. *Field Crops Research*. 60:57-80.

Greenland D J, De Datta S K (1985) Constraint to rice production and wetland soils characteristics. International Rice Research Institute. *Wetland soils: Characterization, classification e utilization*. p559.

Gregersen P L, Holm P B (2007) Transcriptome analysis of senescence in the flag leaf of wheat (*Triticum aestivum L.*). *Journal Plant Biotechnology*. 5:192-206.

Grusak A M, DellaPenna D (1999) Improving the nutrient composition of plants to enhance human nutrition and health. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 50:133-161.

Guthrie R L (1985) Characterizing and classifying wetland soils in relation to food production. *Wetland soils: Characterization, classification and utilization*. p559.

Hallberg L (2001) Perspective on nutritional iron deficiency. *Annual Review of Nutrition*. 21:4-21.

Howarth J R, Parmar S, Jones J, Shepherd C E, Corol D I, Gaister M, Hawkins N D, Miller S J, Baker J M, Verrier P J, Ward J L, Beale M H, Barraciough P B, Hawkesford M J (2008) Co-ordinated expression of amino acid metabolism in response to N and S deficiency during wheat grain filling. *Journal of Experimental Botany*. 13:3675-3689.

Kampfenkel K, Montagu M V, Inzé D (1995) Effects of iron excess on *Nicotiana plumbagnifolia* Plants: implication of oxidative stress. *Plant Physiology*. 107: 725-735.

Lahner B, Gong T, Mahmoudian M, Smith E L, Abid K B, Rogers E E, Guerinot M L, Harper I F, Ward J M, Meintyre L, Schroeder J I, Salt D E (2003) Genomic scale profiling of nutrients and trace elements in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Biotechnology*. 21:1215-1225.

Lanquar V, Lelievre F, Bolte S, Hames C, Alcon C, Neumann D, Vansuyt G, Curie C, Schröder A, Kramer U, Barbie-Brygoo H, Thomine S (2005) Mobilization of vacuolar iron by AtNRAMP3 and AtNRAMP4 is essential for seed germination on low iron. *European Molecular Biology Organization*. 24:4041-4151.

Lauchli A, Epstein E (1970) Transport of potassium and rubidium in plant roots. *Plant Physiology*. 45: 639-641.

Lindsay W (1979) *Chemical equilibria in soils*. New York: John Wiley & Sons. p449.

Lott J N A, Spitzer E (1980) X-ray analysis studies of elements stored in protein body globoid crystals of *Triticum Grains*. *Plant Physiology*. 66: 494-499.

Lucca P, Hurrell R, Potrykus I. (2001) Approaches to improving the bioavailability and level of iron in rice seeds. *Agricultural and food science*. 81:828-834.

Meharg A A, Lombi E, Williams P N, Scheckel K G, Feldmann I, Raab A, Zhu Y, Islam R (2008) Speciation and localization of arsenic in white and brown rice grains. *Environmental Science & Technology*. 42:1051-1057.

Mello J W V (1991) Dinâmica de fósforo, ferro e manganês e disponibilidade de fósforo para o arroz em solos inundados. Tese de doutorado apresentada ao departamento de solos-UFV. p212.

Narayanan N N, Vasconcelos W M, Grusak A M (2007) Expression profiling de *Oryza sativa* metal homeostasis genes in different rice cultivars using a cDNA macroarray. *Plant Physiology and Biochemistry*. 45:277-286.

Ogawa M, Tanaka K, Kasai Z (1979) Accumulation of phosphorus magnesium and potassium in developing rice grains followed by electron microprobe x-ray analysis focusing on the aleurone layer. *Plant and Cell Physiology*. 20:19-27.

Oliveira A B, Nascimento C W A (2006) Formas de manganês e ferro em solos de referência de Pernambuco. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*. 30:99-110.

Ozturk L, Yazici M A, Yucei C, Torun A, Cekic C, Bagci A, Ozkan H, Braun H J, Sayers Z, Cakmak I (2006) Concentration and localization of zinc during seed development and germination in wheat. *Plant Physiology*. 128:144-152.

Ponnamperuma F N, Tianco E M, Loy T (1966) Redox equilibria in flooded soil: The iron hydroxide system. *Soil Science*. V.103. n.6.

Ponnamperuma F N (1972) The chemical of submerged soils. *Advances in Agronomy*. 24:29-96.

Ponnamperuma F N (1978) Electrochemical changes in submerged soils and the growth of rice. *Soils and rice*. International Rice Research Institute (I.R.R.I.) Philippines p 421-441.

Ponnamperuma F N (1985) Chemical Kinetics of Wetland rice soils relative to soil fertility. *Wetland soils: Characterization, classification, and utilization*. p559.

Raboy V (2001) Seeds for a better future: 'Low phytate' grain help to overcome malnutrition and reduce pollution. *Trends in Plant Science*. 10:458-462.

Sauter C, Poletti S, Zhang P, Gruissem W (2006) Symposium on 'Enhancing the nutritional value of plant foods' Biofortification of essential nutritional compounds and trace element in rice and cassava. *Proceeding of the Nutrition Society*. 65:153-159.

Shewry P R, Tatham A S, Barro F, Barcelo P, Lazzeri P (1995) Biotechnology of breadmaking and manipulating the multi-protein gluten complex. *Nature*. 13:1185-1190.

Shewry P R, Halford N G (2002) Cereal seed storage protein: structures, properties and role in grain utilization. *Journal of Experimental Botany*. 53 :947-958.

Shi R, Li H, Tong Y, Jing R, Zhang F, Zou C (2008) Identification of quantitative trait locus of zinc and phosphorus density in wheat (*Triticum aestivum L.*) grain. *Plant and soil*. 306:95-104.

Shotwell M A, Larkins B A (1989) The biochemistry and molecular biology of seed storage protein. *The Biochemistry of Plants*. 5: 297-345.

Stangoulis J C R, Huynh B-L, Welch R M, Choi E-Y, Graham R D (2007) Quantitative trait loci for phytate in rice grain and their relationship with grain micronutrient content. *Euphytica*. 154:289-294.

Takahashi M, Terada Y, Nakai I, Nakanishi H, Yoshimura E, Mori S, Nishizawa N K (2003) Role of nicotianamina in the intracellular delivery of metal and plant reproductive development. *Plant Cell*. 15:1263-1280.

Vreugdentil D, Aarts M G M, Koornneef M, Nelissen H, Ernest W H O (2004) Natural variation and QTL analysis for cationic mineral content in seeds of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell and Environment*. 27:828-839.

Waters B M, Grusak M A (2008) Whole-plant mineral partitioning throughout the life cycle in *Arabidopsis thaliana* ecotypes Columbia, Landsberg erecta, Cape Verde Island, and the mutant line *ys/1ys/3*. *New Phytologist*. 177:389-405.

Welch R M, Graham R D (2004) Breeding for micronutrients in staple food crops from a human nutrition perspective. *Journal of Experimental Botany*. 55:353-364.

White P J, Broadley M R (2009) Biofortification of crops with seven mineral elements often lacking in human diets – iron, zinc, copper, calcium, magnesium, selenium and iodine. *New Phytologist*. 182: 1-35.

Wintz H, Fox T, Wu Y Y, Feng V, Chen W, Chang H S, Zhu T, Vulpe C (2003) Expression profiles of *Arabidopsis thaliana* in mineral deficiencies reveal novel transporters involved in metal homeostasis. *Journal of Biological Chemistry*. 273: 47644-47653.

Wright S (1921) Correlation and causation. *Journal of Agricultural Research*. 20:557-585.

Wright S (1923) The theory of path coefficients – a replay to Niles' criticism. *Genetics*. 8:239-255.

Yang J, Zhang J, Wang Z, Zhu Q, Liu L (2001) Water deficit-induced senescence and its relationship to the remobilization of pre-stored carbon in wheat during grain filling. *Agronomy Journal*. 93:196-206.

Yang J, Zhang J (2006) Grain filling of cereals under soil drying. *The new Phytologist*. 169:223-236.

CAPITULO 2

Conservação de transcritos de famílias gênicas envolvidas na homeostase de ferro em diferentes espécies da família Poaceae

RESUMO

MENDES, Giselle Camargo, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa. Março 2009. **Conservação de transcritos de família gênicas envolvidas na homeostase de ferro em diferentes espécies da família Poaceae.** Orientadora: Andréa Miyasaka de Almeida. Co-orientadores: Antônio Costa de Oliveira e Marco Antonio Oliva Cano.

O ferro é um elemento essencial para os vegetais por participar de processos fundamentais como fotossíntese e respiração. Em arroz, espécie considerada como genoma modelo dentre as gramíneas, são conhecidas diferentes famílias gênicas relacionadas à absorção, transporte e armazenamento de ferro. Aplicando-se o conceito de homologia se pode identificar a presença de genes homólogos em outras espécies da mesma família. Através do estudo *in silico* das famílias gênicas que compõe a rede genética envolvida na homeostase de ferro é possível prever quais *loci* têm maior impacto na seleção para o caráter. O objetivo deste trabalho foi verificar a ocorrência de transcritos homólogos aos genes de arroz (*Oryza sativa*) das famílias ZIP (5 genes), YSL (12 genes), NAS (3 genes), NRAMP (7 genes), FER (3 genes) e FRO (2 genes) em bancos de dados de transcritos gerais de *Sorghum bicolor*, *Zea mays*, *Triticum aestivum* e *Saccharum officinalis* e num banco de dados contendo apenas transcritos seqüenciados a partir do endosperma de milho (*Z. mays*) e com isso prever: 1) quais famílias gênicas estão funcionalmente ativas nestas espécies e 2) quais famílias gênicas são funcionalmente ativas durante a formação do grão de milho. As seqüências das ESTs em arroz foram obtidas a partir do banco de dados NCBI e KOME. As seqüências de ESTs de banco de dados das espécies de gramíneas foram obtidas a partir do programa TIGR-Plant transcripts assemblies e para o banco de endosperma de milho foi obtido do NCBI. Os genes foram alinhados utilizando o programa BLAST2 com a ferramenta TBLASTN com e-value de $1e^{-10}$ e identidade mínima de 40%. Em *Z. mays* foram encontrados cinco homólogos para a família ZIP, dez para YSL, três para NAS, seis para NRAMP e um para FER. Em *S. bicolor* foram encontrados dois homólogos para a família ZIP, doze para YSL, três para NAS, seis para NRAMP e um para FER. Em *S. officinalis* foram encontrados dois homólogos para a família ZIP, onze para YSL, três para NAS, cinco para NRAMP e um para FER. Em *T. aestivum* foram dois homólogos para a família ZIP, onze para YSL, seis para NRAMP e um para FER. Para o endosperma de *Z. mays* foram encontrados homólogos somente para as famílias ZIP (5) e YSL (1). Os resultados confirmam a presença de homologia entre o arroz e as demais espécies em relação às famílias gênicas estudadas, indicando que as mesmas apresentam mecanismos similares de manutenção da homeostase do ferro. Este estudo também indica que possivelmente somente um *locus* representante de cada uma das famílias YSL e ZIP pode ser funcionalmente expresso durante a formação de grãos em milho.

ABSTRACT

MENDES, Giselle Camargo, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa. March 2009. **Conservation of transcripts from gene families involved in iron homeostasis in different Poaceae family species.** Advisor: Andréa Miyasaka de Almeida. Co-Advisors: Antônio Costa de Oliveira and Marco Antonio Oliva Cano.

Iron is an essential element for plants because it participates in fundamental processes such as photosynthesis and respiration. In rice, considered a model species among the grass genomes, there are different gene families known to be related to the absorption, transport and storage of iron. Applying the concept of homology it is possible to identify the presence of homologous genes in other species of the same family. Through *in silico* study of gene families that compose the genetic network involved in iron homeostasis, it is possible to predict which *loci* have greater impact on selection for the character. The objective of this work was to verify the occurrence of transcripts homologous to the genes of rice (*Oryza sativa*) of the families ZIP (5 genes), YSL (12 genes), NAS (3 genes), NRAMP (7 genes), FER (3 genes) and FRO (2 genes) in databases of general transcripts of *Sorghum bicolor*, *Zea mays*, *Triticum aestivum* and *Saccharum officinalis* and a database containing only transcripts sequenced from maize endosperm (*Z. mays*) and thereby provide: 1) gene families which are functionally active in these species and 2) what gene families are functionally active during the formation of a grain of maize. The rice EST sequences were obtained from the NCBI database and Kome. The sequences of ESTs from the database of grasses species were obtained from the program TIGR-Plant transcripts and assemblies for the database of maize endosperm was obtained from NCBI. The genes were aligned using the program BLAST2 with TBLASTN tool with e-value of $1e-10$ and identity of at least 40%. In *Z. mays* it was found five homologous to ZIP family, twelve for YSL, three for NAS, and six for NRAMP and one for FER. In *S. bicolor* it was found two homologous for ZIP family, twelve for YSL, three for NAS, six for NRAMP and one for FER. In *S. officinalis* it was found two homologous for ZIP family, eleven for YSL, three for NAS, five for NRAMP and one for FER. In *T. aestivum* it was found two homologous for ZIP family, eleven for YSL, six for NRAMP, and one for FER. For *Z. mays* endosperm it was found only for the families ZIP (5) and YSL (1). The results confirm the presence of homology between rice and other species for gene families studied, indicating that they have similar mechanisms for maintaining iron homeostasis. This study also indicates that possibly only one locus representative of each YSL and ZIP families can be functionally expressed during the formation of grain in maize.

Introdução

O ferro é um micronutriente essencial para as plantas e está envolvido em processos fundamentais como fotossíntese e respiração (Briat & Lobreaux, 1997). O mineral está presente em duas valências no ambiente, como íon ferroso (Fe^{+2}) e íon férrico (Fe^{+3}). Apesar de sua abundância na crosta terrestre, o ferro presente no solo está em sua maior parte na forma oxidada Fe^{+3} que é pouco absorvida pelas plantas (Curie & Briat, 2003).

Os vegetais apresentam diferentes estratégias de absorção do íon ferro no ambiente. A estratégia I está presente em todos os vegetais com exceção das gramíneas. Nesta estratégia de absorção, ocorre inicialmente uma extrusão de prótons pelas enzimas próton ATPases presentes nas células epidérmicas da raiz, e essa acidificação aumenta a solubilidade do ferro na rizosfera. A redução do Fe^{+3} para forma solúvel Fe^{+2} é realizada por enzimas específicas presentes na membrana plasmática de células epidérmicas da raiz denominadas ferro quelato redutase codificada pelo gene *FRO2* (*Ferric Reductase Oxidase*) já caracterizado em *Arabidopsis thaliana* (Robinson *et al.*, 1999). Após a redução do metal, este é transportado para o interior da célula por transportadores específicos de Fe^{+2} denominados IRT (*Iron Regulated Transporter*) (Eide *et al.*, 1996).

A estratégia II está presente nas gramíneas. Nesta forma de absorção, aminoácidos não protéicos denominados fitosideróforos (FS) são exsudados para rizosfera solubilizando o mineral inorgânico Fe^{+3} formando um complexo Fe^{+3} -FS. O complexo formado é então transportado para dentro da planta por transportadores específicos pertencentes à classe da família protéica YS (*Yellow Stripe*) presentes na membrana plasmática de células epidérmicas radiculares (Curie & Briat, 2003).

O arroz está bem adaptado para crescer em condições alagadas, onde o Fe^{2+} é mais abundante que o Fe^{3+} . Como demonstrado por Ishimaru *et al.* (2006), a localização subcelular verificada por expressão transiente da proteína IRT1 de arroz fusionado a proteína GFP (*Green Fluorescence Protein*) presentes em células epidérmicas radiculares de cebolas evidencia que o arroz possui as duas estratégias de absorção de ferro.

Independentemente da estratégia utilizada, após a absorção do ferro, o mesmo é direcionado para o xilema através de transportadores nas células corticais e em seguida translocado para a parte aérea via fluxo transpiratório (Curie & Briat, 2003). O ferro ao chegar ao xilema é complexado com ácidos orgânicos como o citrato (Cataldo *et*

al.,1988). O complexo Fe^{+3} – citrato ao chegar às células do mesófilo foliar sofre uma redução pela enzima FRO1 que está presente na membrana das células foliares utilizando NADPH como poder redutor (Bruggemann *et al.*,1993).

Os genes pertencentes à família protéica NRAMP (*Natural Resistance Associated Macrophage Proteins*) é responsável pelo transporte de metais nas plantas (Curie *et al.*, 2000). O gene *Nramp1* é expresso preferencialmente em raízes sendo induzido por deficiência de ferro, e dessa forma, estaria relacionado à absorção do micronutriente do solo. Tanto *AtNRAMP3* como *AtNRAMP4* estão localizadas na membrana vacuolar em *Arabidopsis thaliana* e são genes responsáveis pelo transporte de Fe para fora do vacúolo (Lanquar *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2006).

As plantas podem remobilizar o ferro de tecidos senescentes pelo floema. Neste tecido, o ferro está complexado com o ácido orgânico nicotianamina (NA) e quando remobilizado é transportado e distribuído por todo o vegetal. O transporte de Fe-NA no floema requer transportadores específicos. Os 18 genes pertencentes à família protéica de transportadores YSL (*Yellow Stripe Like*) foram identificados em arroz. Esta família foi identificada como fundamental para translocação do metal em toda a planta (Briat *et al.*, 2007).

Após a remobilização, o ferro é compartimentalizado no vegetal para garantir a homeostase. Esse processo de armazenamento é fundamental, visto que o excesso de ferro absorvido pode causar toxidez quando ocorre absorção excessiva deste micronutriente. Os locais de armazenamento conhecidos são apoplasto, vacúolos, mitocôndrias, plastídeos e proteínas como ferritina. Em sementes de arroz, o ferro tem sido armazenado por ferritinas ou ácido fítico (Ogawa *et al.*,1977).

Gramíneas e Arroz como genoma modelo

Taxonomicamente as gramíneas pertencem à família Poaceae. Dentro dessa família se destacam quatro subfamílias: Pooideae, Ehrhartoideae, Chloridoideae e Panicoideae (Devos, 2005) (Figura 1). Na figura 1 é possível visualizar as espécies pertencentes a cada subfamília.

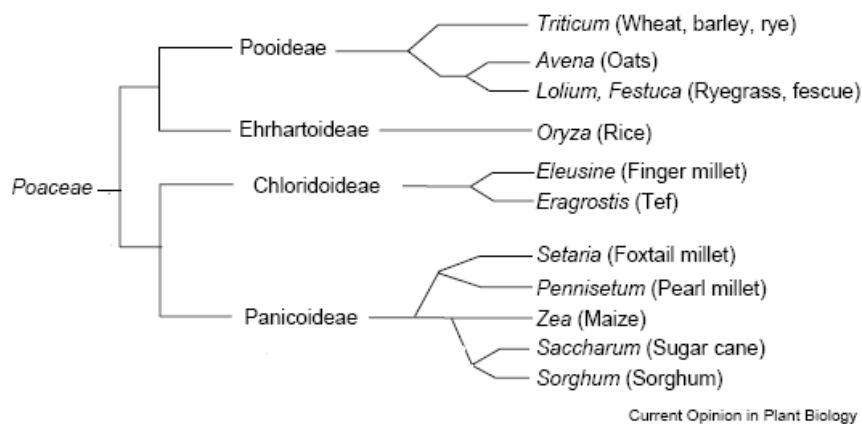


Figura 1. Filogenia das gramíneas mostrando quatro subfamílias que incluem a maioria dos cereais de importância agrônômica. (Devos, 2005).

As gramíneas são classificadas como monocotiledôneas. As espécies de gramíneas diferem entre si pelo tamanho do genoma e número de cromossomos, como exemplo, o arroz com 490 Mpb e 24 cromossomos; sorgo com 809 Mpb e 20 cromossomos; milho com 2793 Mpb e 20 cromossomos; trigo com 16979 Mpb e 42 cromossomos; cana de açúcar com 4183Mb e 80 cromossomos (Alix *et al.*, 1998; Draye *et al.*, 2001; Dolezel *et al.*, 2007).

As espécies de gramíneas possuem regiões conservadas em seu genoma, que são providos por seqüências herdadas de um antepassado comum. Entretanto, existem algumas regiões que apresentam diferenças constituídas basicamente de re-arranjos (duplicações, inserções) e DNA repetitivo (Ilic *et al.*, 2003; Ma *et al.*, 2005; Ma e Bennetzen, 2005).

Nos genomas dos genes da família Poaceae existem regiões conservadas, seqüências homólogas entre si, ou seja, com genes ortólogos (presentes em espécies diferentes, herdadas de um mesmo gene no ancestral) e parálogos (presentes em espécies diferentes e produzidas por duplicação do gene no ancestral comum).

As regiões sintênicas se caracterizam pela a disposição igual dos genes entre espécies diferentes como mostrado na figura 2. As regiões conservados de DNA e/ou genes além da ordem na disposição física nos genomas, são caracterizadas como sintenia (Devos, 2005).

Moore *et al.* (1995), e posteriormente Devos (2005), propuseram um diagrama de círculo que fornece indicações das regiões genômicas que apresentam sintenia entre as gramíneas (Figura 2). O nível de conservação é um importante critério para

estabelecer a comparação, já o alto nível de colinearidade é um pré-requisito para identificar genes candidatos de interesse entre os genes.

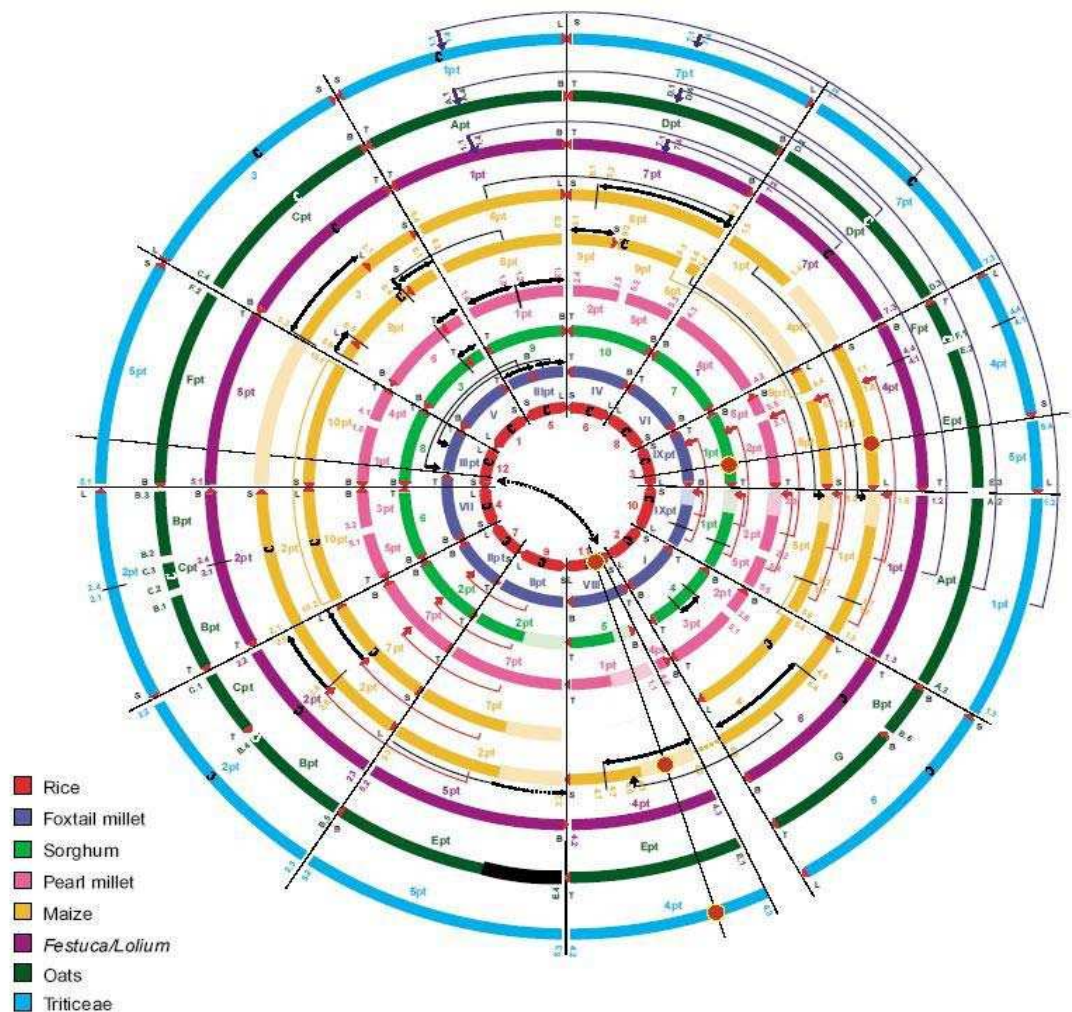


Figura 2. Diagrama em círculo, mostrando a relação dos genomas de oito espécies de três diferentes subfamílias de gramíneas. Cada círculo é um genoma diferente, os triângulos vermelhos indicam os telômeros, os centrômeros são indicados por “C”. Como mostrado na figura acima, os genes *Adh2* em arroz e milho são caracterizados como ortólogos, cromossomo 11 e 4 respectivamente. Genes comuns são conectados por barras rosa (Devos, 2005).

Trabalhos envolvendo a planta modelo dicotiledônea *A. thaliana* com as gramíneas têm comprovado a sintenia e colinearidade entre essas espécies também. Esse fato permite a exploração do genoma da *A. thaliana* para a identificação de genes candidatos para a aplicação no melhoramento de cereais (Devos & Gale, 2000). Para Varshney *et al.* (2005a), os fatos que evidenciam a sintenia e colinearidade entre as

espécies possibilitam novas oportunidades para uma eficiente transferência de informações genéticas entre espécies modelos e/ou para as demais espécies.

Além dos aspectos econômicos e culturais, o arroz é considerado como espécie modelo, pois entre os cereais é a espécie que possui o menor genoma (490 Mpb). Tanto a importância econômica como científica do arroz foram importantes para a criação de um consórcio internacional denominado IRGSP (*International Rice Genome Sequence Project*) formado por vários países, que resultou no seqüenciamento completo do genoma da espécie (IRGSP, 2005).

O acúmulo de resultados em genômica comparativa tem transformado as gramíneas em um único sistema genético, assim os ganhos obtidos no conhecimento de uma espécie podem também beneficiar os investimentos tecnológicos com os outros cereais menos favorecidos pela pesquisa (Varshney *et al.*, 2006).

A importância de estudar espécies da mesma família com base na filogenia é de grande relevância, pois os altos níveis de colinearidade entre as espécies podem ser um indicativo e possibilitar a identificação de genes candidatos para um caráter de interesse (Devos, 2005).

O uso da bioinformática como ferramenta será importante para o estudo de genes já caracterizados relacionados à homeostase de ferro em diversas espécies da família Poaceae. A busca e a identificação por homólogos em bancos de dados específicos irão auxiliar no entendimento e em trabalhos futuros que objetivam utilizar a caracterização molecular para estudos mais profundos (Gross *et al.*, 2003).

O objetivo deste trabalho foi verificar a ocorrência de transcritos homólogos aos genes de arroz (*Oryza sativa*) das famílias ZIP (cinco genes), YSL (doze genes), NAS (três genes), NRAMP (sete genes), FER (três genes) e FRO (dois genes) em bancos de dados de transcritos gerais de *Sorghum bicolor*, *Zea mays*, *Triticum aestivum* e *Saccharum officinalis* e num banco contendo apenas transcritos seqüenciados a partir do endosperma de milho (*Z. mays*) e com isso prever: 1) quais famílias gênicas estão funcionalmente ativas nestas espécies e 2) quais famílias gênicas são funcionalmente ativas durante a formação do grão de milho.

Material e Métodos

Obtenção de seqüências

Como alvos para este estudo, foram considerados a busca de homologias nos bancos de dados contendo transcritos das demais espécies, foram utilizadas seqüências de aminoácidos referentes aos genes caracterizados em experimentos de homeostase de ferro em toda a planta. As seqüências selecionadas referentes às famílias gênicas: redutase oxidase do ferro (FRO), sintase da nicotianamina (NAS), *Zrt/IRT-like protein* (ZIP), *Yellow stripe like* (YSL), *Natural resistance associated macrofage protein* (NRAMP) e ferritina (FER), de *Oryza sativa* foram obtidos a partir banco de dados do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) e KOME (*Knowledge-based Oryza Molecular biological Encyclopedia*) a partir da busca pelo número de identificação (*ID*) conforme mostrados na Tabela 1.

Tabela 1. Lista de genes utilizados no trabalho e seus respectivos números de acessos obtidos no NCBI.

Gene	Acesso NCBI
OsNAS1	AK112069
OsNAS2	AK112011
OsNAS3	AK070656
OsZIP4	AK105258
OsZIP5	AK070864
OsZIP6	AK103730
OsZIP7	AK071272
OsIRT1	AK107681
OsNRAMP1	AK070788
OsNRAMP2	AK065481
OsNRAMP3	AK070574
OsNRAMP4	AK102180
OsNRAMP5	AK066841
OsNRAMP6	AK071485
OsNRAMP8	AK069904
OsFER	AK102242
OsFER	AK106026
OsFER	AK106948
OsYSL1	AK121040
OsYSL2	AB126253
OsYSL4	AK068865
OsYSL5	AK108750
OsYSL6	AK100148
OsYSL7	AK070691
OsYSL9	AK120923
OsYSL10	AK069645
OsYSL12	AK107449
OsYSL14	AK058249
OsYSL15	AK063464
OsYSL16	AK070304
OsYSL18	AK070618
OsFRO1	AK068159
OsFRO2	AK070312

Os arquivos padrão *fasta* contendo seqüências não-redundantes de ESTs (*expressed sequence tags*) obtidos a partir de diversas bibliotecas de sorgo (*Sorghum bicolor*), milho (*Zea mays*), trigo (*Triticum aestivum*) e cana-de-açúcar (*Saccharum officinalis*) foram obtidos a partir do banco de dados TIGR - *Plant transcripts assemblies* (<http://www.tigr.org/plantProjects.shtml#>). Para a biblioteca de transcritos obtidos de biblioteca específica do endosperma de milho, as seqüências foram obtidas a partir do NCBI (Lai *et al.*, 2004). Os transcritos de endosperma de milho posteriormente foram submetidos ao programa CAP3 (Huang e Madan, 1999) para exclusão das seqüências redundantes.

A seqüência dos genes foi alinhada contra o banco de dados de seqüências ESTs através do uso do programa BLAST (Altschul *et al.*, 1990). Foi utilizada a ferramenta TBLASTN (Altschul *et al.*, 1997) e o critério do BLAST como ponto de corte (*cut-off*) foram consideradas homologias com *E-value* inferiores a $1e^{-10}$, mas com identidade mínima de 40% (Conley *et al.*, 2004).

Resultados e Discussão

NAS (Sintase da nicotianamina)

De acordo com as tabelas 2 e 4, houve a presença de homólogos entre os genes da família gênica *OsNAS* para as espécies *Sorghum bicolor*, *Saccharum officinalis* e *Zea mays*. Essas espécies são integrantes da mesma subfamília Panicoideae. A espécie *Triticum aestivum*, pertencente à subfamília Pooideae não apresentou homologias com os genes *OsNAS* (Tabela 3).

Na espécie *Sorghum bicolor* foram verificadas a presença de dois transcritos (Tabela 2). O transcrito TA21790_4558 foi referente aos genes *OsNAS1* e *OsNAS2*, ambos com 76% de identidade, porém, o gene *OsNAS2* foi o que apresentou maior identidade, com um escore de e^{-143} . O transcrito TA22029_4558 foi homólogo ao gene *OsNAS3* com uma identidade de 69%.

Na espécie *Saccharum officinalis* (Tabela 2) foi encontrado apenas o transcrito TA42095_4547 para todos os genes *NAS* utilizados. Entretanto, o transcrito encontrado possui uma região com maior identidade com o gene *OsNAS1*.

Na espécie *Zea mays* (Tabela 4) para o banco de dados geral, foi encontrado apenas o transcrito TA187497_457. Esse transcrito possui uma maior identidade com o gene *OsNAS2* com o escore de e^{-136} .

Os genes da família gênica NAS foram caracterizados em plantas de arroz sob deficiência de ferro, em células que atuam no transporte do mineral a longa distância, evidenciando que NAS e NA estão envolvidas neste processo, além de sua participação na secreção de fitosideróforos pela raiz (Inoue *et al.*, 2003).

ZIP (*Zrt/IRT-like protein*)

De acordo com as tabelas 2, 3 e 4 foram encontrados homólogos aos genes da família gênica *OsZIP* nas espécies *Sorghum bicolor*, *Saccharum officinalis*, *Zea mays* e *Triticum aestivum*.

Na espécie *Sorghum bicolor* foi verificada a presença de dois transcritos (Tabela 2). Os transcritos TA24444_4558 e TA29318_4558 possuem identidades de 62% e 68% com os genes *OsZIP5* e *OsZIP7* respectivamente.

Na espécie *Triticum aestivum* foram encontrados dois transcritos (Tabela 3). Os transcritos TA82184_4565 e TA106634_4565 possuem identidade de 40% com o gene *OsZIP7* e 66% com o gene *OsIRT1* respectivamente.

Na espécie *Zea mays*, no banco geral de transcritos foram encontrados cinco transcritos (Tabela 4). O transcrito TA202109_457 possui identidade de 60% com o gene *OsZIP4*. O transcrito TA189859_457 possui identidade de 58% com o gene *OsZIP5*. O transcrito TA194018_457 possui identidade de 57% com o gene *OsZIP6*. O transcrito TA186033_457 possui identidade de 48% com o gene *OsZIP7*. O transcrito TA189841_457 possui identidade de 63% com o gene *OsIRT1*.

Na espécie *Zea mays*, em banco específico de endosperma foi caracterizado apenas um transcrito referente aos genes *OsZIP4*, *OsZIP5*, *OsZIP6*, *OsZIP7* e *OsIRT1* (Tabela 4). Entretanto, o gene *OsZIP4* apresentou a maior identidade (57%).

O arroz possui a estratégia II de absorção do mineral ferro do solo, em que há absorção de Fe^{3+} ligado a fitosideróforos liberados pela raiz. Entretanto, estudos indicaram que o arroz, assim como as espécies dicotiledôneas, também transporta Fe^{2+} utilizando os genes da família ZIP *OsIRT1* e *OsIRT2* (Bugchio *et al.*, 2002; Ishimaru *et al.*, 2006). A expressão de *IRT1* também foi verificada em folhas e colmos de arroz, sugerindo que o mesmo participa na distribuição e divisão do micronutriente pela planta (Ishimaru *et al.*, 2006; Narayanan *et al.*, 2007). Como mostrado nas tabelas 2, 3 e 4 houve a expressão do gene *IRT1* somente em milho e trigo com homologia de 63 e 66% respectivamente. A presença desse gene em outros genes da família Poaceae indica que esse gene esteja envolvido no processo de absorção de ferro.

NRAMP (*Natural Resistance Associated Macrophage Protein*)

De acordo com as tabelas 2, 3 e 4 foram encontrados homólogos entre os genes da família gênica *OsNRAMP* em arroz, contra as espécies *Sorghum bicolor*, *Saccharum officinalis*, *Zea mays* e *Triticum aestivum*.

Na espécie *Sorghum bicolor* foram verificadas a presença de dois transcritos (Tabela 2). O transcrito TA22705_4558 foi referente aos genes *OsNRAMP1*, *OsNRAMP2* e *OsNRAMP6*. Esse transcrito possui identidade de 74% com o gene *OsNRAMP6*. O outro transcrito TA27012_4558 possui identidade de 45% com o gene *OsNRAMP5*.

Na espécie *Triticum aestivum* foram encontrados quatro transcritos (Tabela 3). O transcrito TA50333_4565 apresentou homologia com os genes *OsNRAMP1* e *OsNRAMP4*, porém esse transcrito apresentou maior identidade (65%) com o gene *OsNRAMP1*. O transcrito TA80107_4565 apresentou identidade com *OsNRAMP2* e *OsNRAMP6*. Porém, esse transcrito apresentou maior identidade (65%) com o gene *OsNRAMP2*. O transcrito BJ269678 apresentou identidade de 64% com o gene *OsNRAMP3*. O transcrito TA91294_4565 apresentou identidade de 47% com *OsNRAMP5*.

Na espécie *Zea mays*, no banco geral de transcritos, foram encontrados três transcritos (Tabela 4). O transcrito TA196411_457 possui identidade com os genes *OsNRAMP1*, *OsNRAMP3* e *OsNRAMP4*. Porém, esse transcrito apresentou maior identidade (71%) com o gene *OsNRAMP1*. O transcrito TA184744_457 apresentou identidade com os genes *OsNRAMP2* e *OsNRAMP6*. Porém, esse transcrito apresentou maior identidade (88%) com o gene *OsNRAMP2*. O transcrito TA201507_457 apresentou identidade 65% com o gene *OsNRAMP5*.

Os genes da família gênica estão amplamente distribuídos em toda a planta e estão envolvidos no transporte de uma variedade de cátions de metais divalentes (Curie *et al.*, 2000; Thomine *et al.*, 2000). As tabelas 2, 3 e 4 mostram a expressão dos genes da família *NRAMP* em todas as espécies podendo sugerir a função de transporte de minerais em outras espécies da família Poaceae.

Em arroz, os genes *OsNRAMP2*, *OsNRAMP4* e *OsNRAMP7* têm expressão elevada em folhas, incluindo a folha bandeira (Narayanan *et al.*, 2007). Entretanto, não foi verificada expressão do gene *OsNRAMP2* em folhas bandeiras de dois genótipos de arroz (BRIRGA 410 e IRGA 410) durante o estágio leitoso (R6) e estágio final de

desenvolvimento do grão no trabalho desenvolvido por nosso grupo de pesquisa (ver tabelas 14 e 15 do capítulo 1).

FER (Ferritina)

De acordo as tabelas 2, 3 e 4 foram encontrados homólogos entre os genes da família gênica *OsFER* para as espécies *Sorghum bicolor*, *Saccharum officinalis*, *Zea mays* e *Triticum aestivum*.

Na espécie *Sorghum bicolor* foi verificada a presença de um transcrito (Tabela 2). O transcrito TA21953_4558 apresentou identidade de 83% com o gene *OsFER1*.

Na espécie *Saccharum officinalis* foi encontrado apenas um transcrito (Tabela 2). O transcrito TA27870_4547 apresentou identidade de 84% com o gene *OsFER1*.

Na espécie *Triticum aestivum* foi encontrado apenas um transcrito (Tabela 3). O transcrito TA57615_4565 apresentou identidade de 85% com o gene *OsFER1*.

Na espécie *Zea mays* foi encontrado apenas um transcrito (Tabela 4). O transcrito X6139 apresentou identidade de 83% com o gene *OsFER1*.

A presença de ferritina nas plantas já foi identificada e essa proteína tem a importante função na compartimentalização de ferro. A proteína é responsável por armazenar cerca de 4500 átomos de ferro disponível, sendo encontrada em tecidos específicos como sementes, raízes e parte aérea (Briat *et al.*, 1999; Curie & Briat, 2003).

O trabalho de Goto *et al.*, (1999) mostrou a importância da expressão do gene da ferritina de sementes de soja em sementes de arroz. Esse trabalho evidencia um aumento na expressão desse gene no endosperma de sementes de arroz e conseqüentemente um aumento na acumulação de ferro no grão, variando de 11,2 $\mu\text{g g}^{-1}$ para 38,1 $\mu\text{g g}^{-1}$. Entretanto, as análises *in silico* deste trabalho, não foi verificado a presença do gene da ferritina de arroz em endosperma específico de milho (tabela 4).

Dois genes com alta homologia entre si, *OsFER1* e *OsFER2* foram clonados em *Oryza sativa* (Gross *et al.*, 2003). O gene *FER1* foi o único encontrado em todas as gramíneas estudadas.

YSL (Yellow Stripe Like)

De acordo as tabelas 2, 3 e 4 foram encontrados homólogos entre os genes da família gênica *OsYSL* para as espécies *Sorghum bicolor*, *Saccharum officinalis*, *Zea mays* e *Triticum aestivum*.

Na espécie *Sorghum bicolor* foram verificadas a presença de três transcritos (Tabela 2). O transcrito TA31655_4558 foi homologos aos genes *OsYSL1*, *OsYSL2*, *OsYSL4*, *OsYSL7*, *OsYSL10*, *OsYSL16* e *OsYSL18*. Dentre estes genes o *OsYSL10* possui maior identidade (68%). O transcrito TA27791_4558 apresentou homologia com os genes *OsYSL5*, *OsYSL14* e *OsYSL15*. Dentre estes genes, o gene *OsYSL14* possui uma maior identidade (84%). O transcrito TA27086_4558 apresentou homologia com os genes *OsYSL6* e *OsYSL9*. Dentre estes o gene *OsYSL6* possui maior identidade (86%).

Na espécie *Saccharum officinalis* foram encontrados quatro transcritos (Tabela 2). O transcrito TA32924_4547 foi homólogo aos genes *OsYSL1*, *OsYSL4*, *OsYSL6*, *OsYSL7*, *OsYSL10* e *OsYSL18*. Dentre estes genes, o *OsYSL6* é o que apresentou a região maior identidade (89%). O transcrito TA35345_4547 foi similar nos genes *OsYSL2*, *OsYSL9* e *OsYSL16*. Dentre estes, o *OsYSL16* é o que apresentou maior identidade (76%). O transcrito TA32925_4547 é homologo ao gene *OsYSL5* com identidade de 71%. O transcrito CA258710 possui uma identidade de 81% com o gene *OsYSL14*.

Na espécie *Triticum aestivum* foram encontrados dois transcritos (Tabela 3). O transcrito TA79323_4565 possui homologia com os genes *OsYSL1*, *OsYSL2*, *OsYSL7*, *OsYSL9*, *OsYSL10*, *OsYSL14*, *OsYSL16* e *OsYSL18*. Dentre estes, o gene *OsYSL14* apresentou a maior identidade (86%). O transcrito TA84663_4565 possui homologia com os genes *OsYSL5* e *OsYSL6*. Dentre estes, o gene *OsYSL6* possui 91% de identidade.

Na espécie *Zea mays*, em bancos gerais de transcritos, foram encontrados quatro transcritos (Tabela 4). O transcrito TA183750_457 possui homologia com os genes *OsYSL1*, *OsYSL4* e *OsYSL6*. Dentre estes, o gene *OsYSL6* que apresentou regiões maior identidade (87%). O transcrito AF18623 possui homologia com os genes *OsYSL2*, *OsYSL9* e *OsYSL16*. Dentre estes, o gene *OsYSL2* é o que possui maior identidade (69%). O transcrito TA194218_457 possui homologia com os genes *OsYSL5* e *OsYSL15*. Dentre estes, o gene *OsYSL5* é o que possui maior identidade (79%). O transcrito TA195032_457 apresenta homologia com os genes *OsYSL7* e *OsYSL18*. Dentre estes, o gene *OsYSL7* possui maior identidade (60%).

Na espécie *Zea mays*, em bancos específicos de endosperma, foi encontrado apenas um transcritos (Tabela 4). Nesse banco de dados, apenas houve identidade de 42% com o gene *OsYSL2*.

De acordo com o trabalho apresentado por Curie *et al.*, (2001) foi caracterizado a expressão do gene *YSL1* raízes de milho sob deficiência de ferro no ambiente. A partir desse trabalho é que foi identificada a presença de genes ortólogos da família YSL em arroz.

A similaridade existente entre as espécies da família Poaceae e a alta conservação existente entre alguns genes da família gênica *YSL* sugere que esses genes têm transporte similar dentro da planta. De acordo com Koike *et al.*, (2004) foi verificada a expressão, por Real Time-PCR, do gene *YSL2* em flores e sementes de arroz submetidas à deficiência de ferro.

Os genes *OsYSL6*, *OsYSL14* e *OsYSL16* são expressos nas raízes e também na parte aérea; *OsYSL15* tem expressão em raízes e *OsYSL2* e *OsYSL13* são expressos preferencialmente na parte aérea. Os genes *OsYSL5*, *OsYSL6*, *OsYSL7*, *OsYSL8* e *OsYSL18* têm elevada expressão em folhas, incluindo a folha-bandeira. Nenhum deles foi ainda caracterizado, mas com base em estudos prévios com outros genes desta família gênica em arroz e outras espécies, é provável que todos contribuam de alguma forma, para o transporte de metais (Narayanan *et al.*, 2007).

FRO (redutase oxidase do ferro)

De acordo as tabelas 2, 3 e 4 foi encontrado homólogos entre os genes da família gênica *OsFRO* para as espécies *Triticum aestivum* e *Zea mays*.

Na espécie *Triticum aestivum* foi encontrado apenas um transcrito (Tabela 3). O transcrito TA67371_4565 apresentou identidade de 71% com o gene *OsFRO1*.

Na espécie *Zea mays* foi encontrado apenas um transcrito (Tabela 4). O transcrito TA184021_457 apresentou identidade de 72% com o gene *OsFRO1*.

O gene *FRO1* foi unicamente expresso em milho e trigo com homologia acima de 70% sugerindo a presença desses homólogos em outras gramíneas (tabelas 2, 3 e 4).

Tabela 2. Genes relacionados à homeostase de Fe em arroz e a presença de homólogos em *Sorghum bicolor* e *Saccharum officinalis*.

Gene	Acesso NCBI	<i>Sorghum bicolor</i>	<i>Saccharum officinalis</i>
OsNAS1	AK112069	TA21790_4558 Identities (76%)ZmNAS1 protein e-134	TA42095_4547 Identities = 202/276 (73%) ZmNAS2 protein e-110
OsNAS2	AK112011	TA21790_4558 Identities = 253/329 (76%) ZmNAS1 protein e-143	TA42095_4547 Identities = 201/276 (72%)ZmNAS2 protein e-109
OsNAS3	AK070656	TA22029_4558 Identities = 218/313 (69%)ZmNAS2 protein e-115	TA42095_4547 Identities = 191/264 (72%)ZmNAS2 protein e-103
OsZIP4	AK105258		
OsZIP5	AK070864	TA24444_4558 Identities (62%)Putative zinc transporter OsZIP2e-106	CA122876 Identities = 118/205 (57%) Putative iron transporter Fe2 Oryza sativa 1e-051
OsZIP6	AK103730		CA217725 Identities = 128/268 (47%)Zinc transporter Oryza sativa 1e-050
OsZIP7	AK071272	TA29318_4558 Identities = 175/255 (68%)Zinc transporter Oryza sativa 5e-085	
OsIRT1	AK107681		TA106634
OsNRAMP1	AK070788	TA22705_4558 Identities = 143/344 (41%)6e-072	TA46009_4547 Identities = 226/375 (60%) Putative OsNRAMP metal ion transporter 1 e-121
OsNRAMP2	AK065481	TA22705_4558 Identities = 143/344 (41%)0.0	
OsNRAMP3	AK070574	TA22705_4558 Identities = 134/342 (39%) 6e-053	TA46009_4547 Identities = 254/328 (77%)Putative OsNRAMP metal ion transporter 1 e-134
OsNRAMP4	AK102180	TA22705_4558 Identities = 148/383 (38%)2e-066	TA46009_4547 Identities = 203/373 (54%) Putative OsNRAMP metal ion transporter 1 e-111
OsNRAMP5	AK066841		TA91294_4566
OsNRAMP6	AK071485	TA22705_4558 Identities = 296/398 (74%)e-174	TA45393_4547 Identities = 276/304 (90%) Metal transporter OsNramp2, putative, expressed Oryza sativa e-157
OsNRAMP8	AK069904		
OsFER1	AK102242	TA21953_4558 Identities (83%) Ferritin-1 Zea mays 6e-098	TA27870_4547 Identities = 170/202 (84%) Ferritin-2, chloroplast precursor Zea mays 4e-098
OsFER2	AK106026		
OsFER3	AK106948		
OsYSL1	AK121040	TA31655_4558 Identities (43%) Hypothetical protein OsYSL14 e-109	TA32924_4547 Identities = 196/478 (41%)2e-097
OsYSL2	AB126253	TA31655_4558 Identities = 216/456 (47%) Hypothetical protein OsYSL14 e-118	TA35345_4547 Identities = 303/407 (74%) Iron transport protein 2 Oryza sativa 0.0
OsYSL4	AK068865	TA31655_4558 Identities = 172/441 (39%)Hypothetical protein OsYSL14 1e-093	TA32924_4547 Identities = 165/460 (35%)1e-082
OsYSL5	AK108750	TA27791_4558 Identities (60%)Hypothetical protein Osysl12 3e-085	TA32925_4547 Identities = 171/238 (71%)e-105
OsYSL6	AK100148	TA27086_4558 Identities = 401/461 (86%)Hypothetical protein osysl6 0.0	TA32924_4547 Identities = 418/466 (89%) 0.0
OsYSL7	AK070691	TA31655_4558 Identities = 207/425 (48%)Hypothetical protein OsYSL14 e-119	TA32924_4547 Identities = 191/470 (40%) 3e-098
OsYSL9	AK120923	TA27086_4558 Identities = 223/429 (51%)Hypothetical protein Osysl6 e-131	TA35345_4547 Identities = 280/406 (68%)Iron transport protein 2 e-169
OsYSL10	AK069645	TA31655_4558 Identities = 302/444 (68%)Hypothetical protein OsYSL14 e-178	TA32924_4547 Identities = 256/458 (55%) e-152
OsYSL12	AK107449		
OsYSL14	AK058249	TA27791_4558 Identities = 175/208 (84%)Hypothetical protein Osysl12 e-101	CA258710 Identities = 166/203 (81%)Hypothetical protein Osysl12 1e-095
OsYSL15	AK063464	TA27791_4558 Identities = 148/266 (55%)Hypothetical protein Osysl12 3e-085	
OsYSL16	AK070304	TA31655_4558 Identities = 207/425 (48%)Hypothetical protein OsYSL14 e-119	TA35345_4547 Identities = 314/409 (76%)Iron transport protein 2 Oryza sativa 0.0
OsYSL18	AK070618	TA31655_4558 Identities = 188/425 (44%)Hypothetical protein OsYSL14 e-112	TA32924_4547 Identities = 184/463 (39%) e-103
OsFRO1	AK068159		CA214868 Identities = 66/208 (31%) 2e-023
OsFRO2	AK070312		

Tabela 3. Genes relacionados à homeostase de Fe em arroz e a presença de homólogos em *Triticum aestivum*.

Gene	Acesso NCBI	<i>Triticum aestivum</i>
OsNAS1	AK112069	
OsNAS2	AK112011	
OsNAS3	AK070656	
OsZIP4	AK105258	
OsZIP5	AK070864	
OsZIP6	AK103730	
OsZIP7	AK071272	TA82184_4565 Identities = 141/349 (40%)1e-058
OsIRT1	AK107681	TA106634_4565 Identities = 196/296 (66%)Iron regulated metal transporter <i>Oryza sativa</i> e-104
OsNRAMP1	AK070788	TA50333_4565 Putative OsNramp1 protein Identities = 199/302 (65%),e-107
OsNRAMP2	AK065481	TA80107_4565 Integral membrane protein <i>Oryza sativa</i> Identities = 253/281 (90%) e-149
OsNRAMP3	AK070574	BJ269678 Putative OsNramp1 protein Identities = 139/215 (64%)6e-074,
OsNRAMP4	AK102180	TA50333_4565 Putative OsNramp1 protein 5e-094 Identities = 171/300 (57%)
OsNRAMP5	AK066841	
OsNRAMP6	AK071485	TA80107_4565 Integral membrane protein <i>Oryza sativa</i> e-110 dentities = 189/280 (67%)
OsNRAMP8	AK069904	
OsFER	AK102242	TA57615_4565 Ferritin <i>Triticum monococcum</i> Identities = 173/202 (85%)1e-098
OsFER	AK106026	
OsFER	AK106948	
OsYSL1	AK121040	TA79323_4565 Oligopeptide transporter OPT-like <i>Oryza sativa</i> Identities = 262/616 (42% e-139
OsYSL2	AB126253	A79323_4565 Oligopeptide transporter OPT-like <i>Oryza sativa</i> dentities = 297/573 (51% e-169
OsYSL4	AK068865	TA79323_4565 Oligopeptide transporter OPT-like <i>Oryza sativa</i> Identities = 244/620 (39%)e-123
OsYSL5	AK108750	TA84663_4565 OSJNBa0055C08.1 protein <i>Oryza sativa</i> Identities = 173/237 (72%) e-104
OsYSL6	AK100148	TA84663_4565 OSJNBa0055C08.1 protein <i>Oryza sativa</i> Identities = 390/426 (91%) 0.0,
OsYSL7	AK070691	TA79323_4565 Oligopeptide transporter OPT-like <i>Oryza sativa</i> Identities = 266/616 (43% e-144
OsYSL9	AK120923	TA79323_4565 Oligopeptide transporter OPT-like <i>Oryza sativa</i> Identities = 320/595 (53%), 0.0,
OsYSL10	AK069645	TA79323_4565 Oligopeptide transporter OPT-like <i>Oryza sativa</i> Identities = 402/607 (66%)0.0
OsYSL12	AK107449	
OsYSL14	AK058249	TA79323_4565 Oligopeptide transporter OPT-like <i>Oryza sativa</i> Identities = 182/210 (86% e-105
OsYSL15	AK063464	TA84663_4565 Identities = 166/293 (56%), 2e-097
OsYSL16	AK070304	TA79323_4565 Oligopeptide transporter OPT-like <i>Oryza sativa</i> Identities = 300/594 (50%),e-170
OsYSL18	AK070618	TA79323_4565 Oligopeptide transporter OPT-like <i>Oryza sativa</i> Identities = 266/611 (43%),e-148
OsFRO1	AK068159	TA67371_4565 Ferric reductase <i>Oryza sativa</i> Identities = 490/685 (71%), 0.0
OsFRO2	AK070312	

Tabela 4. Genes relacionados à homeostase de Fe em arroz e a presença de homólogos em banco de *Zea mays* geral e específico para endosperma.

Gene	Acesso NCBI	<i>Zea mays</i> geral	<i>Zea mays</i> endosperma 200AA	<i>Zea mays</i> endosperma 100AA
OsNAS1	AK112069	TA187497_457 Identities (76%) e-131		
OsNAS2	AK112011	TA187497_457 Identities (76%) e-136		
OsNAS3	AK070656	TA187497_457 Identities (76%) e-109		
OsZIP4	AK105258	TA202109_457 Identities = 194/323 (60%)2e-098		Contig165 Identities = 91/158 (57%) 2e-046
OsZIP5	AK070864	TA189859_457 Identities = 204/347 (58%)e-107	Contig165 Identities = 134/304 (44%) 4e-061	Contig165 Identities = 134/304 (44%) 4e-061
OsZIP6	AK103730	TA194018_457 Identities = 177/307 (57%) 5e-081		Contig165 Identities = 69/164 (42%) 1e-029
OsZIP7	AK071272	TA186033_457 Identities = 193/400 (48%)6e-090	Contig165 Identities = 166/305 (54%) 8e-084	Contig165 Identities = 166/305 (54%) 8e-084
OsIRT1	AK107681	TA189841_457 Identities = 139/220 (63%)e-115		Contig165 Identities = 69/143 (48%) 9e-035
OsNRAMP1	AK070788	TA196411_457 Identities = 296/414 (71%)e-166		
OsNRAMP2	AK065481	TA184744_457 Identities = 408/463 (88%) 0.0		
OsNRAMP3	AK070574	TA196411_457 Identities = 195/328 (59%)7e-094		
OsNRAMP4	AK102180	TA196411_457 Identities = 228/395 (57%) e-122		
OsNRAMP5	AK066841			
OsNRAMP6	AK071485	TA184744_457 Identities = 358/522 (68%) 0.0		
OsNRAMP8	AK069904			
OsFER	AK102242	X6139 Identities = 168/202 (83%)3e-097		
OsFER	AK106026			
OsFER	AK106948			
OsYSL1	AK121040	TA183750_457 Identities = 149/365 (40%)e-146		
OsYSL2	AB126253	AF18623 Identities = 469/676 (69%) 0.0		Endosperm_5 Ze mays Identities = 52/121 (42%) 1e-018
OsYSL4	AK068865	TA183750_457 Identities = 121/361 (33%) e-122		
OsYSL5	AK108750	TA194218_457 Identities = 191/239 (79%) e-109		
OsYSL6	AK100148	TA183750_457 Identities = 311/356 (87%)0.0		
OsYSL7	AK070691	TA195032_457 Identities = 420/700 (60%)0.0		
OsYSL9	AK120923	AF18623 Identities = 423/632 (66%)0.0		
OsYSL10	AK069645	TA203757_457 Identities = 191/306 (62%)0.0		
OsYSL12	AK107449			
OsYSL14	AK058249			
OsYSL15	AK063464	TA193740_457 Identities = 234/303 (77%)e-142		
OsYSL16	AK070304	AF18623 Identities = 451/675 (66%) 0.0		
OsYSL18	AK070618	TA195032_457 Identities = 300/701 (42%) e-166		
OsFRO1	AK068159	TA184021_457 Identities = 527/725 (72%) 5e-075		
OsFRO2	AK070312	TA184021_457 Identities = 174/474 (36%) 0.0		

Alinhamentos dos genes de endosperma de milho

O endosperma é um tecido fonte de amido que é consumido durante o processo de germinação do embrião. Entre os cereais, o endosperma de milho tem sido amplamente estudado devido ao seu tamanho e mutações que ocorrem envolvendo mudanças na aparência do grão (Lai *et al.*, 2004). Nas figuras A1 a A5 estão representados os alinhamentos das seqüências homólogas encontradas no endosperma de milho com os genes de arroz (anexos).

Os genes ortólogos de arroz encontrados no endosperma foram apenas os genes da família gênica ZIP e o gene YSL2. Apesar da baixa identidade com variação entre 42 a 57% entre os genes de arroz (figuras A1 a A5) e do banco de endosperma de milho, pode-se sugerir que a família gênica ZIP tem importância no transporte de ferro e outros minerais para o grão. Como já descrito anteriormente, o gene OsYSL2 foi expresso em sementes de arroz (Koike *et al.*, 2004), entretanto, o gene YSL2 está presente em endosperma de milho com baixa homologia (42%).

Conclusões

As gramíneas são muito próximas geneticamente, e a utilização de uma planta modelo, como o arroz, para a busca de homologias entre genes da mesma família se torna possível e viável.

Neste trabalho foi possível caracterizar que a família gênica NAS possui alta conservação (cerca 70%) entre os genes da família Poaceae estudada, com exceção do trigo e banco de endosperma de milho. O gene OsFER1 apresentou alta identidade (cerca de 80%) entre todos os genes de Poaceae. Isto sugere a importância dessas famílias gênicas no transporte e teor de ferro entre as espécies de Poaceae.

As seqüências homólogas relacionadas a homeostase de ferro encontradas nos bancos de dados de sorgo, cana de açúcar, trigo, milho é de grande importância para o entendimento dos mecanismos de homeostase de ferro em outras espécies de gramíneas.

ANEXOS

Figura A1. Alinhamento da seqüência homóloga encontrado no endosperma de milho com o gene *OsZIP4*.

```

Query= zip5
(353 letters) Database: trs_milho
5499 sequences; 4,255,094 total letters

Score E
Sequences producing significant alignments: (bits) Value

Contig1652 237 1e-063
Length = 1188

Score = 237 bits (604), Expect = 1e-063
Identities = 134/304 (44%), Positives = 177/304 (58%), Gaps = 49/304 (16%)
Frame = +1

Query: 99 VHILPAAFEALSSPCLVGGPWKRFPFAGMVAMVSAIGTLIVDTVATGYF----HRTDAKR 154
      VH+L A EALS PCL PW+RFPF G VAM++A+GTL+ D V T + H DA+
Sbjct: 13 VHMLHDADEALSDPCLPAAPWRRFPFPGFVAMLAALGLTVDFVGVTHMYERKKHHADAE- 189

Query: 155 KAAVADEPADDLEASDE----- 172
      +AA V + AS
Sbjct: 190 EAAVVVGNASSSANASGHDVIVALLQD GALVASTGSSIGRDGGGGHKDPMHIVGMHAHAAA 369

Query: 173 HSHGHAHGMSVMSVAPAGEED---LVRHRVISQVLELG VVVHSLIIGMSLGASDFPSTVR 229
      H H HAHG G ++ RH V+SQ+LELG+V HS+IIG+SLG S P T++
Sbjct: 370 HRHSHAHGHPCCDDCHDGHDEEPSQARHV VVSQILELGIVSHSVIIGLSLGVSNPCTIK 549

Query: 230 PLVPALTFHQFFEGIGLGGCIVQAKFRVRSVVTMALFFSLTTPAGIVVIGISSVYDANS 289
      PL AL+FHQFFEG LGGCI +A+F+ S + MA FF++TTPAGI VG GI+S Y+ NS
Sbjct: 550 PLGAALSFHQFFEGFALGGCISEAQKFSFALLMAFFFAITTPAGITVGSGLASFYNPNS 729

Query: 290 PTALVVQGLLEAAAAGILVYMALVDILAEDFMKTKVQRRGRRLQLAMNVALLLGAGLMSMI 349
      P ALVV+G+L+++ +AGIL+YMALVD++A DF+ ++ RLQ+ +AL LGA M+ +
Sbjct: 730 PRALVVEGILDSISAGILIYMALVDLIAADFLSKRMSCNLRQLQVGSYIALFLGAMAMASL 909

```

Figura A2. Alinhamento da seqüência homologa encontrado no endosperma de milho com o gene *OsZIP5*.

```

Query= zip6
(395 letters)

Database: trs_milho
5499 sequences; 4,255,094 total letters

Score E
Sequences producing significant alignments: (bits) Value

Contig1652 126 3e-030

>Contig1652
Length = 1188

Score = 126 bits (316), Expect = 3e-030
Identities = 69/164 (42%), Positives = 98/164 (59%)
Frame = +1

Query: 232 ARRQKQKMSKVLGIVFHSVIIGVTMGMSQDVCAIRPLVVALSFHQVFEGMGLGGCIAQ 291
      ++ + +VS++LE+GIV HSVIIG+++G+SQ+ C I+PL ALSFHQ FEG LGGCI++
Sbjct: 439 SQARHV VVSQILELGIVSHSVIIGLSLGVSNPCTIKPLGAALSFHQFFEGFALGGCISE 618

Query: 292 AGFGIATVGYMCMVFSVTTPGLGILLGMAIFHMTGYDDSSPNAXXXXXXXXXXXXXXXXXVYM 351
      A F + M F++TTP GI+G I + Y+ +SP A +YM
Sbjct: 619 AQFKSFSALLMAFFFAITTPAGITVGSGL--ASFYNPNSPRALVVEGILDSISAGILIYM 792

Query: 352 ALVDLISLDFHXXXXXXXXXXXXXXXXYVALVLGSASMSILALWA 395
      ALVDLI+ DF Y+AL LG+ +M+ LA+WA
Sbjct: 793 ALVDLIAADFL-SKRMSCNLRQLQVGSYIALFLGAMAMASLAIWA 921

```

Figura A3. Alinhamento da seqüência homologa encontrado no endosperma de milho com o gene *OsZIP6*.

```

Query= zip7
(384 letters) Database: trs_milho
5499 sequences; 4,255,094 total letters Score E
Sequences producing significant alignments: (bits) Value

Contig1652 298 6e-082 Length = 1188
|
Score = 298 bits (762), Expect = 6e-082
Identities = 165/304 (54%), Positives = 193/304 (63%), Gaps = 15/304 (4%)
Frame = +1

Query: 96 FVHMLHDAEHALSSPCLPAHPWRSFPFPGFVAMSAALATLVLDLFLATRFYEGK-HRAETE 154
FVHMLHDA+ ALS PCLPA PWR FPFPGFVAM AAL TLV DF+ T YE K H A+ E
Sbjct: 10 FVHMLHDADEALSDPCLPAAPWRRFPFPGFVAMLAALGTLVDFVGTHTMYERKKHHADAE 189

Query: 155 RVKXXXXXXXXXXXXXXXXXITVV-----TVTEDDNDNKAPL-LQXXXXXXXXXX 200
+ V ++ D +K P+ +
Sbjct: 190 EAAVVVGNASSSANASGHDVIVALLQDQALVASTGSSIGRDGGGHHKDPMHIVGMHAHAAA 369

Query: 201 XXXXXXXXELAQPEGSGGEGEVPAQVRSVVVSQILEMGIIVSHSVIIGLSLGVSRSPCTIR 260
+ G E P+Q R VVVSQILE+GIVSHSVIIGLSLGVSVV+PCTI+
Sbjct: 370 HRHSHAHGHGPCDDCHDGHDEEPSQARHVVSQILELGIIVSHSVIIGLSLGVSNPCTIK 549

Query: 261 PLVAALSFHQFFEGFALGGCIAQAQFKTLSAAMACFFXXXXXXXXXXXXXXXXXSFYNANS 320
PL AALSFHQFFEGFALGGCI++AQFK+ SA +MA FF SFYN NS
Sbjct: 550 PLGAALSFHQFFEGFALGGCISEAQFKSFSALLMAFFFAITTPAGITVGSIGIASFYNPNS 729

Query: 321 PRALVVEGILDSVSAGILIYMSLVDLIAADFLGGKMTGSTRQQVMAYIALFLGALSMSSL 380
PRALVVEGILDS+SAGILIY+LVDLIAADFL +M+ + R QV +YIALFLGA++M+SL
Sbjct: 730 PRALVVEGILDSISAGILIYMALVDLIAADFLSKRMSCNLRLQVGSYIALFLGAMAMASL 909

Query: 381 AIWA 384
AIWA
Sbjct: 910 AIWA 921

```

Figura A4. Alinhamento da sequência homologa encontrado no endosperma de milho com o gene *OsZIP7*.

```

Query= OsIRT1
(374 letters) Database: trs_milho
5499 sequences; 4,255,094 total letters
Sequences producing significant alignments: Score E (bits) Value

Contig1652 150 1e-037 Length = 1188

Score = 150 bits (380), Expect = 1e-037
Identities = 103/304 (33%), Positives = 137/304 (45%), Gaps = 41/304 (13%)
Frame = +1

Query: 112 YMHVLPDAFNNTSPCLPRKPWSEFP---FAAFVAMLAA----VSTLM-----AD 154
++H+L DA L+ PCLP PW FP F A +A L V T M A+
Sbjct: 10 FVHMLHDADEALSDPCLPAAPWRRFPFPGFVAMLAALGTLVDFVGTHTMYERKKHHADAE 189

Query: 155 SLMLTYNRSKPRPSSGGDV-----AAVADHGESPDQXXXXXXXXXXXXXXXXXMAVAKP- 205
+ N S +SG DV A VA G S + M
Sbjct: 190 EAAVVVGNASSSANASGHDVIVALLQDQALVASTGSSIGRDGGGHHKDPMHIVGMHAHAAA 369

Query: 206 -----DDVEATXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXHSVVIIGLGMGASQNVCTIR 250
D HSV+HGL +G SQN CTI+
Sbjct: 370 HRHSHAHGHGPCDDCHDGHDEEPSQARHVVSQILELGIIVSHSVIIGLSLGVSNPCTIK 549

Query: 251 PLVAAMCFHQMFEGMGLGGCILQAIEYGRMRSVLVFFFSTTTTFFGIALGLALTRVYRDNS 310
PL AA+ FHQ FEG LGGCI +A++ ++ FFF+ TTP GI +G + Y NS
Sbjct: 550 PLGAALSFHQFFEGFALGGCISEAQFKSFSALLMAFFFAITTPAGITVGSIGIASFYNPNS 729

Query: 311 PTALIVVGLLNAASAGLLHYMALVELLAADFMGPKLQGNVRLQXXXXXXXXXXXXXXXXXMSVM 370
P AL+V G+L++ SAG+L YMALV+L+AADF+ ++ N+RLQ M+ +
Sbjct: 730 PRALVVEGILDSISAGILIYMALVDLIAADFLSKRMSCNLRLQVGSYIALFLGAMAMASL 909

Query: 371 AKWA 374
A WA
Sbjct: 910 AIWA 921

```

Figura A5. Alinhamento da sequência homologa encontrado no endosperma de milho com o gene *OsIRT1*.

```

Query= YSL2
      (255 letters)

Database: trs_milho
      5499 sequences; 4,255,094 total letters

Sequences producing significant alignments:
                                     Score      E
                                     (bits) Value
gi|31355147|gb|CD439504.1|CD439504 ELO1N0525F09.b Endosperm_5 Ze...      89      3e-019
>gi|31355147|gb|CD439504.1|CD439504 ELO1N0525F09.b Endosperm_5 Zea
      mays cDNA, mRNA sequence
      Length = 704

Score = 89.0 bits (219), Expect = 3e-019
Identities = 47/98 (47%), Positives = 59/98 (60%)
Frame = +2

Query: 26 AAERVPPWREQVTARGMVAALLIGFVYTVIIMKLALTTGIIPTLNVSAALLAFLALRGWT 85
      A + VP WREQ+T R V + L+ +++VI+MKL LTTGIIP+LNVSA LL F +R WT
Sbjct: 428 ADKAVPSWREQLTLRAFVVSALLAVMFSVIVMKLNLTTGIIPSLNVSAAGLLGFFFVRMWT 607

Query: 86 XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXFTRQENTVVQTCVAVACY 123
      FTRQENTV+QTC V+ Y
Sbjct: 608 -----AAAERMGFLRQPFTRQENTVIQTCVVSAY 694

```

Figura A6. Alinhamento da seqüência homóloga encontrado no endosperma de milho com o gene *OsYSL2*.

Referências Bibliográficas

Alix K, Baurens F-C, Paulet F, Glaszmann J-C, D'Hont A (1998) Isolation and characterization of satellite DNA family in the *Saccharum* complex. *Genome*. 41: 854–864.

Altschul S F, Gish W, Miller W, Myers E W, Lipman D J (1990) Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*. 215:403-410.

Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller Wand Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*. 25:3389-3402.

Briat J F, Lobreaux S (1997) Iron transport and storage in plants. *Trends in Plant Science*. 2:187–193.

Briat J-F, Curie C, Gaymard F (2007) Iron utilization and metabolism in plants. *Plant Biology*. 10:276-282.

Bruggemann W, Maass-Kantel K, Moog P R (1993) Iron uptake by leaf mesophyll cells: the role of the plasma membrane bound ferric-chelate reductase. *Planta*. 190:151–155.

Bughio N, Yamaguchi H, Nishizawa N K, Nakanishi H, Mori S (2002) Cloning an iron regulated metal transporter from rice. *Journal of Experimental Botany*. 53:1677-1682.

Cataldo D A, Mcfadden K M, Garland T R, Willdung R E (1988) Organic constituents and complexation of nickel (II), iron (III), cadmium (II), and plutonium (IV) in soybean xylem exudates. *Plant Physiology*. 86:734–39

Conley E J, Nduati V, Gonzalez-Hernandez J L, Mesfin A, Trudeau-Spanjers M, Chao S, Lazo G R, Hummel D D, Anderson O D, Qi L L, Gill B S, Echaliier B, Linkiewicz A M, Dubcovsky J, Akhunov E D, Dvor J, Peng J H, Lapitan N L V, Pathan M S, Nguyen H T, Ma X F, Miftahudin, Gustafson J P, Greene R A, Sorrells M E, Hossain K G, Kalavacharla V, Kianian S F, Sidhu D, Dilbirligi M, Gill K S, Choi D W, Fenton R D, Close T J, McGuire P E, Qualset C O, Anderson J A (2001) A 2600-locus chromosome bin map of wheat homoeologous group 2 reveals interstitial gene-rich island and colinearity with rice. *Genetics*. 168:625-637.

Curie C, Alonso J M, Jean M L, Ecker J R, Briat J F (2000) Involvement of NRAMP1 from *Arabidopsis thaliana* in iron transport. *Biochemical Journal*. 347:749-755.

Curie C, Alonso J M, Le Jean M, Ecker J R, Briat J-F (2001) Maize yellow stripe1 encodes a membrane protein directly involved in Fe(III) uptake. *Nature*. 409:346-349.

Curie C, Briat J F (2003) Iron transport and signaling in plants. *Annual Review of Plant Physiology*. 54: 183-206.

Devos K M, Gale M D (2000) Genome relationships: the grass model in current research. *Plant Cell*. 12: 637-646.

- Devos K** (2005) Updating the "Crop Circle." *Current Opinion in Plant Biology*. 8:155-162.
- Dolezel J, Kubaláková M, Paux E, Barlos J, Feuillet C** (2007) Chromosome-based genomics in the cereals. *Chromosome Research*. 15:51-66.
- Draye X, Lin Y-R, Qian X-y, Bowers J E, Burow G B, Morrell P L, Peterson D G, Presting G G, Ren S-x, Wing R A, Paterson A H** (2001) Toward integration of comparative genetic, physical, diversity, and cytomechanical maps for grasses and grain, using the sorghum genome as a foundation. *Plant Physiology*. 125:1325–1341.
- Eide D, Broderius M, Fett J P, Guerinot M L** (1996) A novel iron-regulated metal transporter from plants identified by functional expression in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 93: 5624-5628.
- Goto F, Yoshihara T, Shigenoto N, Tuki S, Takaiwa F** (1999) Iron fortification of rice seeds by the soybean ferritin gene. *Natural Biotechnology*. 17: 282-286.
- Gross J, Stein R.J, Fett-Neto A G, Fett J P** (2003) Iron homeostasis related genes in rice. *Genetics and Molecular Biology*. 4: 477-497.
- Huang X, Madan A** (1999) CAP3: A DNA sequence assembly program. *Genome Research*. 9:868-877.
- Ilic K, Sanmiguel PJ, Bennetzen J L** (2003) A complex history of rearrangement in an orthologous region of the maize, sorghum, and rice genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 100:12265-12270.
- Inoue H, Higuchi K, Takahashi M, Nakanishi H, Mori S, Nishizawa N K** (2003) 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*. 36:366-381.
- International Rice Genome Sequencing Project** (2005) The map-based sequence of the rice genome. *Nature*. 1:793-800.
- Ishimaru Y, Suzuki M, Tsukamoto T, Suzuki K, Nakazono M, Kobayashi T, Wada Y, Watanabe S, Matsushashi S, Takahashi M, Nakanishi H, Mori S, Nishisawa NK** (2006) Rice plants take up iron as an Fe³⁺-phytosiderophore and as Fe²⁺. *The Plant Journal*. 45: 335-346.
- Kellogg E A** (2001) Evolutionary history of the grasses. *Plant Physiology*. 125:1198-1205.
- Kim S A., Punshon T, Lanzirotti A, Li L, Alonso J M, Ecker J R, Kaplan J, Guerinot M L** (2006) Localization of iron in Arabidopsis seed require the vacuolar membrane transporter VIT1. *Science*. 314:1295-1298.
- Koike S, Inoue H, Mizuno D, Takahashi M, Nakanishi H, Mori S, Nishizawa N K** (2004) OsYSL2 is a rice metal-nicotianamine transporter that is regulated by iron and expressed in the phloem. *The Plant Journal*. 39:415-424.

Lai J, Dey N, Kim C-S, Bharti A K, Rudd S, Mayer K F X, Larkins B A, Becraft P, Messing J (2004) Characterization of maize endosperm transcriptome and its comparison to the rice genome. *Genome Research*. 14:1932-1937.

Lanquar V, Lelievre F, Bolte S, Hames C, Alcon C, Neumann D, Vansuyt G, Curie C, Schröder A, Kramer U, Barbie-Brygoo H, Thomine S (2005) Mobilization of vacuolar iron by AtNRAMP3 and AtNRAMP4 is essential for seed germination on low iron. *European Molecular Biology Organization Journal*. 24:4041-4151.

Ma J, Sanmiguel P J, LAI J, Messing J, Bennetzen J L (2005) DNA rearrangement in orthologous orp regions of the maize, rice and sorghum. *Genomes*. *Genetics*. 170:1209-1220.

Ma J, Bennetzen J L (2005) Recombination, rearrangement, reshuffling, and divergence in a centromeric region of rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 10:383-388.

Moore G, Devos K M, Wang Z, Gale M D (1995) Grasses line up and form a circle. *Current Biology*. 5:737-739.

Naraynan N N, Vasconcelos M W, Grusak M A (2007) Expression profiling of *Oryza sativa* metal homeostasis genes in different rice cultivars using a cDNA macroarray. *Plant Physiology and Biochemistry*. 45:277-286.

Ogawa M, Tanaka N., Kasai Z (1977) Note on the phytin-containing particles isolated from rice scutellum. *Cereal Chemistry*. 54:1029-1034.

Robinson N J, Proctor C M, Connolly, M L, Guerinot (1999) A ferric chelate reductase for iron uptake from soils. *Nature*. 397: 694-697.

Thomine S, Wang R, Ward J M, Crawford N M, Schroeder J I (2000) Cadmium and iron transport by members of a plant metal transporter family in Arabidopsis with homology to Nramp genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 97: 4991-4996.

Varshney R K, Graner A, Sorrells M E (2005) Genomics-assisted breeding for crop improvement. *Trends in Plant Science*. 10: 621-630.

Varshney R K, Hoisington D A, Tyagi A K (2006) Advances in cereal genomics and applications in crop breeding. *Trends in Biotechnology*. 24:490-499.