

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ABC
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E HUMANAS

**PROGRAMA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA PIC e PIBIC/UFABC, PIBIC(-AF),
PIBITI/CNPq**

EDITAL 04/2022

**Análise do sistema radicular de cultivares de arroz com alta e baixa
predileção por arsenato**

Junho de 2022

TÍTULO DO PROJETO:

Análise do sistema radicular de cultivares de arroz com alta e baixa predileção por arsenato

RESUMO

O arroz (*Orzya sativa L.*) é uma monocotiledónea de grande importância comercial, já que é um dos cereais mais consumidos mundialmente. Logo, há um grande interesse em estudar mecanismos de absorção de elementos tóxicos e quais impactos esses elementos trazem para o desenvolvimento vegetal. Um desses elementos é o arsênio (As), um semimetal que é bioacumulado, que pode ser encontrado naturalmente no meio ambiente e que vem sendo usado em produtos de atividade industrial, poluindo o ambiente. O arsênio é mais comumente encontrado no ambiente nas formas inorgânicas As(III) e As(V) que, por sua vez, possuem um alto nível de toxicidade tanto para plantas quanto para aqueles que a consomem. Estudos anteriores mostraram que o arsênio pode afetar a arquitetura da raiz de plantas mas que a arquitetura das raízes também pode modular a absorção de arsênio. Além disso, outros estudos realizados com arroz mostram que a predileção por As varia de acordo com a cultivar, ou seja, com seu genótipo. No entanto, não se sabe ao certo se características morfológicas, como semelhança na arquitetura da raiz, ajudam a explicar por que algumas cultivares apresentam maior ou menor predileção por As. Com isso, o projeto tem o intuito de identificar se há estruturas morfológicas do sistema radicular em comum presentes em cultivares de *Orzya sativa L.* que possuem baixa e alta predileção por As (V). Para isso, as cultivares brasileiras comerciais de arroz EMBR1, 2 e 3 (baixa predileção) e EMBR 28,29 e 30 (alta predileção) serão germinadas na presença e na ausência de As (V) e a morfologia geral da raiz será analisada. Os dados como comprimento das raízes, número e comprimento de raízes adventícias e pelos radiculares entre outras características, serão coletados e comparados entre as cultivares e entre os grupos com maior ou menor predileção por As(V) na presença e ausência do contaminante, o que vai possibilitar uma análise dos efeitos do As (V) nas raízes de plantas desses grupos.

Palavras-chave: arroz, arsênio, morfologia, raiz, cultivares brasileiras

1. INTRODUÇÃO

O arroz consumido mundialmente é constituído principalmente por amido, minerais, proteínas, e vitamina B. Sua riqueza nutricional acarretou na inserção de seus grãos à dieta cotidiana (ALMEIDA, 2019) e por volta de 2,4 milhões de pessoas em escala mundial consomem o arroz no dia-a-dia (EMBRAPA, 2018). Dados apresentados no último volume de monitoramento de mercado de arroz produzido pela FAO (Food and Agriculture Organization) apontam que diversos países asiáticos tiveram suas atividades agrícolas afetadas no ano de 2017 devido a enchentes ou secas durante sua principal fase de colheita (FAO, 2018), eventos esses que irão se intensificar devido às mudanças climáticas. De acordo com projeções das mudanças climáticas, milhões de pessoas irão viver sob condições severas de restrição hídrica (Stringer *et al.*, 2021), possivelmente fazendo com que águas subterrâneas passem a ser usadas tanto para uso doméstico como para a irrigação da agricultura (Podgorski and Berg, 2020).

Recentemente, foi criado um mapa da predição global da contaminação de arsênio em águas subterrâneas (Podgorski e Berg, 2020). De acordo com esse mapa, a maior parte das áreas contaminadas se localiza na Ásia, maior produtora de arroz do mundo, mas também em algumas regiões da América do Sul, incluindo o Brasil. Apesar dos benefícios do seu consumo, dados mostram que seus grãos podem apresentar uma alta concentração do arsênio (As) se cultivado em solos contaminados (DURGANTE, 2014). Por ser um cereal muito consumido no mundo, existe uma preocupação em se estudar os diversos mecanismos de absorção de elementos tóxicos pelo arroz uma vez que vários desses elementos, inclusive o arsênio, podem ser bioacumulados fazendo com que o consumo a longo prazo de alimentos contaminados representem um risco à saúde humana e animal (GENG *et al.*, 2017).

A planta do arroz é a *Oryza sativa* L, uma monocotiledônea que pertence à família Poacea e que possui um caule oco no qual há nós e entrenós bem visíveis. Essa estrutura recebe o nome de colmo dividido em um principal e um conjunto de colmos primário, secundário e terciário (**Figura 1**) (FONESCA *et al.*, 2008). O sistema radicular de arroz é do tipo fibroso, como ocorre em outras monocotiledôneas como trigo (*Triticum aestivum*) e milho (*Zea mays*) (Stringer *et al.*, 2021). Este tipo de sistema radicular consiste em uma massa densa de raízes adventícias, comumente chamada em cereais de raízes da coroa, que se originam de células próximas ao cilindro de feixes vasculares periférico do caule (**Figura 2**) (Atkinson *et al.*, 2014). Essas raízes são diferentes da raiz primária, raízes laterais e pelos radiculares presentes no sistema radicular axial das dicotiledôneas (Coudert *et al.*, 2010). Em monocotiledôneas, as

raízes primárias (embrionárias) perecem com o tempo e as raízes adventícias passam a exercer a função da raiz primária no sistema radicular fibroso.

Figura 1 – Estrutura morfológica do arroz (Fonte adaptada: CAMPOS et al, 2014)

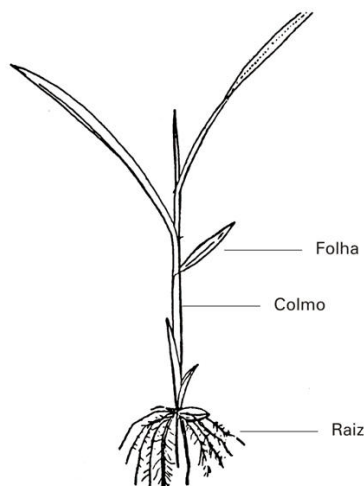
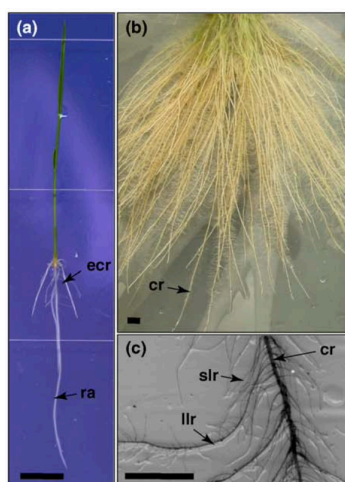


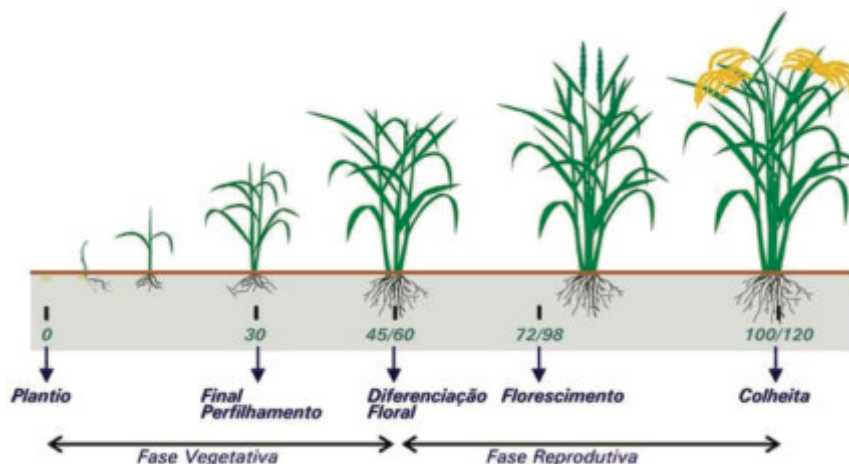
Figura 2 – Arquitetura de raízes do arroz. (a) Sistema radicular de plântulas de arroz (cultivar Nipponbare) 1 semana após a germinação; (b) Sistema radicular de plantas de arroz de 40 dias; (c) Detalhe de uma raiz da coroa. cr, raiz da coroa; llr, raiz lateral grande; ra, radícula; slr, raiz lateral pequena. (Fonte: Coudert et al, 2010).



O ciclo de vida do arroz é dividido em fases: fase de plântula e fase vegetativa (**Figura 3**), que quando inundados leva um período de 100 a 120 dias e sequeiro de 110 a 155 dias. Estas

características variam entre as cultivares, que são a introdução de novas características que trazem maior eficiência para os agricultores que posteriormente são selecionadas as de maior qualidade (BONOW et al, 2007). A forma de cultivo do arroz é definida por seus diferentes cultivares que trazem necessidades específicas de plantio. As primeiras espécies cultivadas introduzidas no Brasil, são derivadas de uma subespécie japônica (SOSBAI, 2018).

Figura 3 – Fases fenológicas do arroz (Fonte adaptada: CAMPOS et al, 2014)



O arsênio é um semimetal, com número atômico 33 e massa atômica de 74,92 u.m.a, que pode adquirir uma configuração orgânica (monometil arsênio ou MMA e dimetil arsênio ou DMA) ou inorgânica As^{3+} (arsenito ou As III) e As^{5+} (arsenato ou As V). Essa substância é encontrada em seu estado natural no meio ambiente por meio de reações biológicas, vulcanismo e entre outros, ou através de ações antrópicas como o uso de agrotóxicos (BARRA et al. 1999). Estes semimetais inorgânicos possuem o nível de toxicidade elevado e são altamente solúveis em água e móveis no solo, o que implica na contribuição para a absorção destes componentes pelo o arroz (DURGANTE, 2014), já que na maioria das vezes o arroz é cultivado em solos inundados (EMBRAPA, 2018).

Sabe-se que o As (V) é absorvido pelas raízes através dos transportadores de fosfato (Abbas *et al.*, 2018). As(V) é estruturalmente semelhante a fosfato e compete pelo mesmo sítio de ligação de transportadores de fosfato de alta afinidade (Zvobgo *et al.*, 2018). Estes transportadores pertencem a subfamília PHOSPHATE TRANSPORTER 1 (PHT1) (López-Arredondo *et al.*, 2014; Abbas *et al.*, 2018). Em arroz, o transportador de fosfato PHT1 OsPT8 possui um papel importante na absorção de As(V) do solo e variações nos seus níveis de

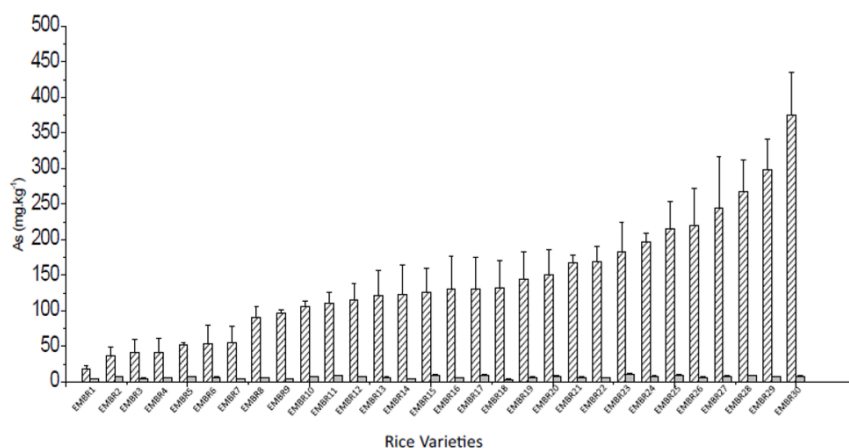
expressão em raízes explicam as diferenças observadas na tolerância a arsenato em diferentes variedades de arroz (Wang *et al.*, 2016). De forma semelhante, a superexpressão do gene *OsPT8* aumentou a absorção de As(V) em plantas transgênicas de arroz (Wu *et al.*, 2011). Outros dois transportadores PHT1, OsPT1 and OsPT4, também parecem estar envolvidos na absorção de As(V), uma vez que linhagens com níveis elevados e reduzidos de *OsPT1* e *OsPT4* resultaram em um aumento e diminuição da absorção de As(V), respectivamente, quando comparados com plantas do tipo selvagem (Kamiya *et al.*, 2013; Ye *et al.*, 2017; Cao *et al.*, 2017).

Quanto aos efeitos de As no desenvolvimento radicular, a presença de As (III) no meio de cultura resulta no aumento dos pelos radiculares e na diminuição do comprimento da raiz principal quando comparadas a plantas controle de *Arabidopsis thaliana* crescidas na ausência deste contaminante (BAHMANI *et al.*, 2016). Outros estudos indicam que o As (V) provoca alteração na distribuição de hormônios essenciais presentes no sistema radicular no arroz, que consequentemente, altera sua morfologia radicular (ROZAN *et al.*, 2018). Ademais, dados obtidos previamente pelo grupo mostraram que plantas de *Arabidopsis thaliana* tratadas com As(V) apresentaram uma diminuição da zona de alongamento da raiz e um aumento do número de pelos radiculares com a morfologia alterada (pelos com formato mais sinuoso) (Soares, 2020). Portanto, o As(V) parece afetar a morfologia da raiz o que pode acarretar em uma alteração da absorção de As pela planta.

Além do arsênio afetar a arquitetura e morfologia das plantas, a estrutura morfológica do sistema radicular também parece influenciar na absorção do As. Estudos realizados com arroz mostraram que o acúmulo de arsênio é maior nos ápices radiculares do que na base da raiz e que quanto mais finas as raízes e maior número de ápices radiculares, maior o acúmulo de arsênio (Deng *et al.*, 2021).

Já se sabe que as diferentes cultivares e espécies de arroz possuem níveis de absorção de As distintos (SURIYAGODA; DITTERT; LAMBERS, 2018). Um estudo realizado previamente (B.L.Batista, comunicação pessoal) submeteu 30 cultivares comerciais brasileiras de arroz à 3 ppm de As⁵⁺ por 45 dias e observou diferentes níveis de predileção por As(V) (**Figura 4**).

FIGURA 4- Concentração de arsênio obtida em 30 cultivares brasileiros de arroz, plantados em inundação e em uma exposição de 3 ppm de As (V) por 45 dias.



Ainda não se sabe quais características de cada cultivar podem explicar as diferenças pela maior ou menor predileção por As. Uma das possíveis explicações é que as cultivares podem apresentar maior/menor abundância dos transportadores de As nas raízes. Uma outra possível explicação é que as cultivares com maior predileção por As tenham um sistema radicular mais semelhante entre si e que permitam que absorvam/acumulem muito As. Por outro lado, as cultivares com menor predileção por As podem ter outras características morfológicas da raiz em comum que possam explicar, pelo menos em parte, a baixa predileção por As.

Dessa forma, uma análise detalhada das diferenças estruturais e morfológicas de raízes das cultivares de maior e menor predileção ao arsênio e como estas interagem com o meio de absorção com ou sem o contaminante podem auxiliar na compreensão de como essas cultivares acumulam mais ou menos arsênio nas raízes.

2. OBJETIVO

Analisar a estrutura morfológica das raízes de cultivares de arroz que tem maior ou menor predileção por arsênio na presença e ausência de 150 ppb de As.

3. METODOLOGIA

3.1 Reagentes

Preparo de soluções de As (V) em concentração de 1000 ppm a partir do sal As_2O_5 , considerando suas massas. Estas soluções serão colocadas em um frasco âmbar em temperatura a -20°C e utilizadas para diluir até as concentrações utilizadas neste estudo em água ultrapura.

3.2 Plantio do material vegetal

A espécie cultivada de arroz será da *Oryza sativa* L. As sementes serão esterilizadas e passarão por teste de germinação para avaliação do vigor e da viabilidade de sementes. As cultivares utilizadas serão o EMBR1, 2 e 3 (cultivares com baixa predileção por As) e EMBR28, 29 e 30 (alta predileção por As).

O processo de esterilização das sementes ocorrerá de acordo com o Bevitori (2013). As sementes serão colocadas em uma solução de 20 ml de água destilada e 2 gotas de Tween 20 e agitadas por 30 segundo, após o descarte da solução as sementes serão lavadas em uma solução de etanol 70% por 1 minuto que depois é descartada cuidadosamente para que não ocorra a perda de sementes. Em seguida, a uma solução de 2,5% de hipoclorito será adicionado e as sementes serão agitadas por 20 minutos e, finalmente com o descarte da solução de hipoclorito, as sementes serão lavadas com água destilada estéril por, pelo menos, 8 vezes com um volume de 50 ml. Com o processo finalizado, as sementes serão colocadas em placas de petri, forradas com um papel filtro, inseridas em um ambiente úmido e escuro, por 48 horas e depois expostas a um fotoperíodo de 16 horas luz/8h escuro (260 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ PFD) por 5 dias a 28°C . Após a germinação das sementes, as plântulas que estiverem no mesmo estágio de desenvolvimento, serão colocadas em uma placa de petri com e sem o contaminante, por pelo menos 7 dias (5 plântulas por placa). Este número pequeno de sementes por procedimento, possibilita que a coleta seja realizada mais facilmente e desenvolvam em um meio menos competitivo. Essas plântulas serão transplantadas para um sistema de hidroponia contendo um meio previamente descrito por (Du *et al.*, 2019) na presença ou ausência de 150 ppb de As(V) em casa de vegetação.

3.3 Coleta e Análise das amostras

Primeiramente, as amostras serão coletadas após um período de 7 dias, tempo de crescimento inicial da planta, onde ainda há raízes seminais com estrutura radicular e há o início da formação das raízes adventícias. Iremos acompanhar o crescimento do sistema radicular das plantas até 30 dias após a germinação, fase em que o sistema radicular das plantas é predominantemente composto pelas raízes adventícias (raízes da coroa). Após a coleta, as

plantas serão fixadas em paraformaldeído a 4% em PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄. pH 7,4) e armazenadas a 4°C até o momento de análise.

Em relação a análise a morfologia externa radicular, as seguintes características serão analisadas:

- Comprimento das raízes, utilizando réguas e lupa (Nikon), se necessário;
- Número de raízes principais, secundárias e adventícias (se houver);
- Pelos radiculares, em relação a sua quantidade por área da raiz;
- Comprimento do pelo radicular;

Para realizar a avaliação de parâmetros de pelos das raízes, estas serão montadas em lâminas histológicas em água ou 10% glicerol e serão observadas em um microscópio de campo claro (Olympus) ou estereoscópio e as imagens serão obtidas utilizando uma câmera fotográfica acoplada a estes equipamentos.

Para contagem de número e tamanho de pelos radiculares, as plântulas serão imersas durante 30 segundos, com o auxílio de uma pinça, em uma solução de 0,05% de azul Toluidina e em seguida enxaguadas em água destilada. As plântulas serão colocadas em uma placa de petri de vidro contendo água destilada, cobrindo a raiz, e imagens serão coletadas por meio de um estereomicroscópio com câmera acoplada (Zeiss). A contagem dos pelos será executada usando o software ImageJ.

3.4 Análises dos resultados obtidos

Os dados obtidos serão aplicados teste ANOVA utilizando o software pacote de estatística SYSTAT.

3.5 Estudo bibliográficos

Será reservado um tempo para a pesquisa e leitura de bibliografia que possam auxiliar nos métodos, análises e parâmetros, como também agregar informações, conhecimento e credibilidade à pesquisa.

3.6 Apresentação e elaboração de relatórios

No final do projeto e concluído todas as etapas será possível a participação do simpósio de Iniciação Científica, como também outros congressos da área. Além disso, a elaboração de relatórios que apresentem os procedimentos e resultados finais/parciais.

4. Viabilidade do projeto

O projeto será realizado integralmente na UFABC, utilizando espaços de laboratório no campus de SBC e SA. O crescimento vegetal bem como as análises posteriores serão realizadas em laboratórios da UFABC que possuem equipamentos e infraestrutura necessários para a realização do projeto. Este é um projeto piloto que poderá abrir novos caminhos de investigação para o conhecimento do efeito de arsênio em plantas, fazendo parte de um projeto maior que já contou com outros alunos anteriormente.

Este projeto é similar a um projeto enviado anteriormente para a CPIC no edital de 2020, mas que não foi executado devido às restrições de acesso aos laboratórios durante a pandemia de SARS-Cov2 no ano de 2020/21. Com o fim das restrições de acesso ao campus, o projeto foi revisado e está sendo enviado para nova apreciação.

5. CRONOGRAMA

Etapas	Quadrimestre		
	1º	2º	3º
Teste de germinação/esterilização com sementes	X		
Plantio das sementes EMBR1, 28, 29 e 30 com e sem As V	X	X	
Análise morfológica externa das raízes	X	X	X
Análise estatística dos dados obtidos		X	X
Leitura da bibliografia	X	X	X
Elaboração de relatórios parciais e finais		X	X

6. BIBLIOGRAFIAS

ABBAS, Ghulam et al. Arsenic uptake, toxicity, detoxification, and speciation in plants: physiological, biochemical, and molecular aspects. **International journal of environmental research and public health**, v. 15, n. 1, p. 59, 2018.

ALMEIDA, Raphael Lucas Jacinto et al. Produção e caracterização nutricional e tecnológica do amido de arroz vermelho modificado enzimaticamente. 2019.

ATKINSON, Jonathan A. et al. Branching out in roots: uncovering form, function, and regulation. **Plant Physiology**, v. 166, n. 2, p. 538-550, 2014.

BAHMANI, Ramin et al. The density and length of root hairs are enhanced in response to cadmium and arsenic by modulating gene expressions involved in fate determination and morphogenesis of root hairs in Arabidopsis. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, p. 1763, 2016.

BARRA, Cristina Maria et al. Especificação de arsênio-uma revisão. **Química Nova**, v. 23, p. 58-70, 2000.

BATISTA, B. L. Arsênio e arroz: monitoramento e estudos de (bio)remediação para segurança alimentar. UFABC, Projeto FAPESP 2014/05151-0. agos. 2019. Disponível em: <<https://bv.fapesp.br/pt/bolsas/187304/arsenio-e-arroz-monitoramento-e-estudos-de-bioremediacao-para-seguranca-alimentar/>> Acesso em: mai. 2020

BEVITORI, Rosângela. Cultivo in vitro do arroz (*Oryza sativa* L.): conceitos básicos e protocolo. **Embrapa Arroz e Feijão-Documents (INFOTECA-E)**, 2013.

BONOW, Sandro et al. Caracterização morfológica de cultivares de arroz visando à certificação da pureza varietal. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, p. 619-627, 2007.

CAMPOS, V.; VINICIUS, A.; CARMO, R. A Cultura do Arroz. UNEMAT. Caceres, MT. 2014. Disponível em: <<https://pt.slideshare.net/andrevinicius444/cultura-do-arroz-slide-simplificado>> Acesso em: mai. 2020

CAO, Yue et al. Knocking out OsPT4 gene decreases arsenate uptake by rice plants and inorganic arsenic accumulation in rice grains. **Environmental Science & Technology**, v. 51, n. 21, p. 12131-12138, 2017.

COUDERT, Yoan et al. Genetic control of root development in rice, the model cereal. **Trends in plant science**, v. 15, n. 4, p. 219-226, 2010.

CUNHA, Pedro D. Rodrigues; DUARTE, António AL. Remoção de arsénio em águas para consumo humano. 2008.

DENG, Xiao et al. Variations in root morphological indices of rice (*Oryza sativa* L.) induced by seedling establishment methods and their relation to arsenic accumulation in plant tissues. **Environmental Pollution**, v. 281, p. 116999, 2021.

DU, Fan et al. Influence of different arsenic species on uptake, speciation and efflux of arsenic in hydroponic rice plants. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 186, p. 109791, 2019.

DURGANTE, Juliano. Arsênio em arroz comercial: um potencial risco à saúde humana. 2014.

EMBRAPA, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Catálogo de Cultivares de Arroz: safra 2017 – 2018. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/172107/1/35118.pdf>> Acesso em: mai. 2020 27 nov. 2018 Acesso em: jul. 2022

FAO, F. and A. O. of the U. N. Rice Market Monitor april 2018. [s.l: s.n.]. Available in: <http://www.fao.org/economic/RMM> > Accessed in: may. 2020

FONSECA, Jaime Roberto Fonseca et al. **Descritores botânicos, agronômicos e fenológicos do arroz (*Oryza sativa* L.)**. Embrapa Arroz e Feijão, 2008.

GENG, Anjing et al. Arsenic accumulation and speciation in rice grown in arsanilic acid-elevated paddy soil. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 137, p. 172-178, 2017.

KAMIYA, Takehiro et al. Phosphate deficiency signaling pathway is a target of arsenate and phosphate transporter OsPT1 is involved in As accumulation in shoots of rice. **Soil science and plant nutrition**, v. 59, n. 4, p. 580-590, 2013.

LÓPEZ-ARREDONDO, Damar Lizbeth et al. Phosphate nutrition: improving low-phosphate tolerance in crops. *Annu Rev Plant Biol*, v. 65, n. 1, p. 95-123, 2014.

PODGORSKI, Joel; BERG, Michael. Global threat of arsenic in groundwater. **Science**, v. 368, n. 6493, p. 845-850, 2020.

RONZAN, M. et al. Cadmium and arsenic affect root development in *Oryza sativa* L. negatively interacting with auxin. **Environmental and Experimental Botany**, v. 151, p. 64-75, 2018.

SOSBAI, Arroz Irrigado. Recomendações técnicas da pesquisa para o sul do Brasil. **XXIX REUNIÃO TÉCNICA DA CULTURA DO ARROZ IRRIGADO**, 2012.

STRINGER, Lindsay C. et al. Climate change impacts on water security in global drylands. **One Earth**, v. 4, n. 6, p. 851-864, 2021.

SURIYAGODA, Lalith DB; DITTERT, Klaus; LAMBERS, Hans. Mechanism of arsenic uptake, translocation and plant resistance to accumulate arsenic in rice grains. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 253, p. 23-37, 2018.

WANG, Peitong et al. The role of OsPT8 in arsenate uptake and varietal difference in arsenate tolerance in rice. **Journal of experimental botany**, v. 67, n. 21, p. 6051-6059, 2016.

WU, Chuan et al. Oxic and anoxic conditions affect arsenic (As) accumulation and arsenite transporter expression in rice. **Chemosphere**, v. 168, p. 969-975, 2017.

WU, Zhongchang et al. Investigating the contribution of the phosphate transport pathway to arsenic accumulation in rice. **Plant Physiology**, v. 157, n. 1, p. 498-508, 2011.

YE, Ying et al. OsPT4 contributes to arsenate uptake and transport in rice. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, p. 2197, 2017.

ZVOBGO, Gerald et al. Phosphate alleviates arsenate toxicity by altering expression of phosphate transporters in the tolerant barley genotypes. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 147, p. 832-839, 2018.