

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA
MOLECULAR**

**ANÁLISE DO PERFIL IONÔMICO E DE RESPOSTAS AO ESTRESSE POR
CALOR EM ACESSOS DE *ORYZA AUSTRALIENSIS***

Aléxis Cardama Kin

Porto Alegre, Janeiro de 2021

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA
MOLECULAR**

**ANÁLISE DO PERFIL IONÔMICO E DE RESPOSTAS AO ESTRESSE POR
CALOR EM ACESSOS DE *ORYZA AUSTRALIENSIS***

Aléxis Cardama Kin

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do título de **Mestre em Genética e Biologia Molecular**.

**Orientadora: Profa. Dra. Márcia Margis-Pinheiro
Coorientadora: Dra. Paloma K. Menguer**

Porto Alegre, Janeiro de 2021

Instituição e Fonte Financiadoras

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Genética Molecular Vegetal do Departamento do Departamento de Genética do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, com auxílio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

“Algo só é impossível até que alguém duvide
e resolva provar ao contrário”

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente a Deus e a minha família, em especial a minha mãe Viviana Cardama Guedes e minha avó Edith Guedes, pois sem vocês eu jamais estaria aonde estou agora, agradeço a educação, os valores que me foram passados, incentivos e dedicações, e acima de tudo, por ter vocês em minha vida. À minha amada namorada Lariane Frâncio e sua família, por todo amor, incentivo, carinho e apoio em todos os momentos, mesmo nos momentos difíceis.

Agradeço ao PPGBM pelos ensinamentos, em especial a minha orientadora Profa. Dra. Márcia Margis-Pinheiro e co-orientadora Dra. Paloma K. Menguer, pelos ensinamentos, confiança, orientação, motivação, compreensão e puxões de orelhas, com os quais me proporcionaram crescer profissionalmente e pessoalmente. Aos colaboradores deste trabalho, Prof. Dr. Filipe Ricachenevsky e Dr. Yugo Lima Melo, pelos ensinamentos, amizade e companheirismo que me foram dados ao longo destes anos.

Ao nosso grupo do laboratório, agradeço a todos pela amizade, ensinamentos, em especial aos colegas Breno e Thomaz, que me auxiliaram em diversos momentos, tanto alegres quanto difíceis e sobre os diversos assuntos e teorias que surgiam de nossas conversas. Agradeço a técnica do laboratório Letícia pelo auxílio e amizade.

Agradeço a todos, que de alguma forma contribuíram para este trabalho e meu desenvolvimento profissional e pessoal.

Muito obrigado!

RESUMO

O arroz (*Oryza sativa* L.) é uma das principais culturas alimentares do mundo, alimento básico para cerca de três bilhões de pessoas. Apesar de sua importância como fonte de carboidratos, o arroz branco possui baixas concentrações de nutrientes essenciais, dentre eles os micronutrientes ferro (Fe) e zinco (Zn), essenciais à saúde humana. Devido às mudanças climáticas, a temperatura pode aumentar 2,5 °C até 2050. Nesse cenário, eventos como ondas de calor seriam mais frequentes e de maior duração. O estresse por alta temperatura pode causar danos significativos às plantas com subsequente perda de rendimento e produtividade. O arroz é especialmente suscetível ao calor durante seu desenvolvimento e fertilização. O gênero *Oryza* inclui 27 espécies, dentre as quais duas espécies cultivadas, sendo distribuídas e adaptadas a diferentes ambientes ao redor do planeta, o que as torna uma fonte potencial de alelos e de novos mecanismos que podem contribuir para o melhoramento de características nutricionais e adaptabilidade a estresses bióticos e abióticos em *Oryza sativa*. *Oryza australiensis* é uma planta perene, amplamente distribuída ao norte de Queensland (Austrália), e a única representante do genoma EE no gênero *Oryza*. Em trabalhos já publicados, foi demonstrado que a espécie possui uma rubisco ativase (Rca) termotolerante que mantém suas variáveis fotossintéticas e de crescimento ativos quando exposta à altas temperaturas. Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar a termotolerância de nove acessos de *O. australiensis* e identificar novos mecanismos envolvidos na termotolerância dessa espécie. Adicionalmente, avaliamos a concentração de macro e micronutrientes em folhas e sementes desses acessos. Em experimentos de estresse por calor o acesso AUS1 apresentou indução de crescimento de parte aérea e variáveis de fotossíntese comparáveis ao tratamento controle, ao contrário do que foi observado para *O. meridionalis* e *O. sativa*. Esse mesmo acesso teve aumento significativo apenas para Fe e Zn no grão, dos 14 elementos analisados, quando comparado com genótipos de *O. sativa*. Por fim, montamos o experimento de estresse por calor com plantas do acesso AUS1 e *Oryza sativa* cv. Nippombare e coletamos amostras de folha para análise de transcriptoma. As extrações de RNA já foram realizadas e as amostras serão enviadas para sequenciamento o mais breve possível. Com o transcriptoma, acreditamos que novos genes e mecanismos serão encontrados na resposta de tolerância ao calor de *O. australiensis*.

Palavras-chave: Estresse, Calor, Ionomia, *Oryza australiensis*, *Oryza sativa*

ABSTRACT

Rice (*Oryza sativa* L.) is one of the main food crops in the world, a staple food for about three billion people. Despite its importance as a source of carbohydrates, white rice has low concentrations of essential nutrients, including the micronutrients iron (Fe) and zinc (Zn), essential to human health. Due to climate change, the temperature may rise by 2.5 °C by 2050. In this scenario, events such as heat waves would be more frequent and of longer duration. High temperature stress can cause significant damage to plants with subsequent loss of yield and productivity. Rice is especially susceptible to heat during development and fertilization. The *Oryza* genus includes 27 species, in addition to two cultivated species, being distributed and adapted to different environments around the planet, which makes them a potential source of alleles and new mechanisms that can contribute to the improvement of nutritional characteristics and adaptability to biotic and abiotic stresses in *Oryza sativa*. *Oryza australiensis* is a perennial plant, widely distributed in northern Queensland (Australia), and the only representative of the EE genome in the *Oryza* genus. In works already published, it was demonstrated that the species has a thermotolerant rubisco activase (Rca) that keeps the photosynthetic and growth parameters active when exposed to high temperatures. Thus, the present study aimed to evaluate the thermotolerance of nine accessions of *O. australiensis* and to identify new mechanisms involved in the thermotolerance of this species. Additionally, we evaluated the concentration of macro and micronutrients in leaves and seeds of these accessions. In heat stress experiments, the AUS1 access showed shoot growth induction and photosynthesis parameters comparable to the control situation, contrary to what was observed for *O. meridionalis* and *O. sativa*. This same access had a significant increase only for Fe and Zn in the grain, of the 14 elements analyzed, when compared with *O. sativa* genotypes. Finally, we set up the heat stress experiment with plants from the AUS1 and *Oryza sativa* cv. Nippombare and collected leaf samples for transcriptome analysis. The RNA extractions have already been carried out and the samples will be sent for sequencing as soon as possible. With the transcriptome, we believe that new genes and mechanisms will be found in the heat tolerance response of *O. australiensis*.

Key words: Stress, Heat, Iron, *O. australiensis*, *Oryza sativa*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação das espécies selvagens de arroz na Austrália.....	34
Figura 2 - Incubadora cilíndrica montada para realização do estresse por calor a 45 °C....	39
Figura 3 - Concentração de macroatmentos em folhas de acessos de <i>O. australiensis</i> e genótipos de <i>O. sativa</i>	43
Figura 4 - Concentração de macroatmentos em sementes de acessos de <i>O. australiensis</i> e genótipos de <i>O. sativa</i>	44
Figura 5 - Concentração de microatmentos em folhas de acessos de <i>O. australiensis</i> e genótipos de <i>O. sativa</i>	45
Figura 6 - Concentração de microatmentos em sementes de acessos de <i>O. australiensis</i> e genótipos de <i>O. sativa</i>	46
Figura 7 - Medidas de comprimento de planta de acessos de <i>O. australiensis</i> e genótipos de <i>O. sativa</i> , após os 7 dias de recuperação.	47
Figura 8 - Representação do experimento conduzido em alta temperatura.....	49
Figura 9 - Parâmetros fotossintéticos avaliados durante o experimento de estresse por calor (45 °C) por 72 horas (3 dias).	52
Figura 10 - Parâmetros fotossintéticos avaliados após a recuperação de 7 dias.....	53
Figura 11 - Parâmetros fotossintéticos obtidos durante 1h a temperatura de 40 °C.....	54
Figura 12 - Eletroforese das amostras de RNA de plantas coletadas ao final do segundo dia de tratamento a 45 °C e ao terceiro dia de recuperação a 28 °C.	55
Figura 13 - Comparação entre os pesos de matéria fresca e seca de plantas expostas ao estresse por calor após a recuperação de 7 dias à 28 °C.....	56
Figura 14 - Concentração de carboidratos solúveis totais e amido em folhas dos acessos coletados ao final do terceiro dia (72h) de tratamento por calor.	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Genótipos e acessos das espécies do gênero <i>Oryza</i> utilizados para experimentos por estresse por calor.	36
Tabela 2 - Espécies do gênero <i>Oryza</i> utilizadas para avaliação do perfil ionômico em sementes e folhas.	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

As – Arsênio

ANOVA - Análise de Variância

B – Boro

Ca – Cálcio

Cd – Cádmio

cm – Centímetros

cm² – Centímetros quadrados

CO₂ – Dióxido de carbono

Cu – Cobre

cv – Cultivar

°C – Graus Celsius

DNA – Ácido desoxirribonucleico

Fe – Ferro

g – Grama

h – Unidade de tempo em horas

HSP – (Proteína de choque térmico, do inglês *heat shock protein*)

HSF – (Fator de choque térmico, do inglês *heat shock factor*)

H₂O – Água

ICP-MS – *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*

IRGA – (Sistema de trocas gasosas por infravermelho, do inglês *Infrared Gas Analyser*)

IRRI – (Instituto Internacional de Investigação do Arroz, do inglês *International Rice Research Institute*)

K – Potássio

Kb – Kilobase (Quilo bases)

KOH – Hidróxido de potássio

KPa – KiloPascal (Quilo Pascal)

Mb – Mega pares de bases (pb)

Mg – Magnésio

ml – Mililitro

min – Minutos

Mn – Manganês

mmol – Milimol

Mo – Molibdênio

mol - Mol

MS – Meio de cultura Murashige e Skoog

Na – Sódio

NaOH – Hidróxido de sódio

OMS – Organização Mundial da Saúde

ONU – Organização das Nações Unidas

P – Fósforo

PA – Parte aérea da planta

pb – Pares de bases

pH – Potencial hidrogeniônico

PMF – Peso massa fresca

PMS – Peso massa seca

ppm – Partes por milhão

PPFD – (Densidade de Fluxo de Fótons Fotossintéticos, do inglês *Photosynthetic Photon Flux Density*)

RNA – Ácido Ribonucleico

Rubisco – Ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase oxigenase

Rca – Rubisco ativase

S – Enxofre

s – Unidade de tempo em segundos

W - Watts

V - Volts

Zn – Zinco

$\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ – Micro molar por metro quadrado por segundo

$\mu\text{mol.g}^{-1}$ – Micro molar por grama

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1 O aquecimento global e a segurança alimentar mundial	14
1.2 Impacto molecular, celular e fisiológico do estresse por calor em plantas	17
1.2.1 Aspectos moleculares da resposta ao estresse por calor em plantas	19
1.2.2 Sinalização celular do estresse por calor em plantas	21
1.2.3 Inibição da fotossíntese no estresse por calor em plantas	22
1.2.4 Metabólitos primários e secundários na resposta ao estresse por calor em plantas	24
1.3 Arroz	29
1.4 O gênero <i>Oryza</i>	30
1.5 <i>Oryza australiensis</i>	32
2 OBJETIVOS	35
2.1 Objetivo Geral	35
2.2 Objetivos Específicos	35
3 MATERIAL E MÉTODOS	36
3.1 Análises de elemento minerais em grãos e folhas por ICP-MS	36
3.2 Material vegetal e condições de crescimento	37
3.3 Montagem da incubadora e tratamento por alta temperatura em espécies do gênero <i>Oryza</i>	37
3.4 Extração de RNA e Construção das Bibliotecas para o Sequenciamento de Transcriptoma (RNA-seq)	40
3.5 Variáveis Fisiológicas	40
3.5.1 Crescimento e Peso de Massa Fresca e Seca	40
3.5.2 Variáveis fotossintéticas	40
3.5.3 Concentrações de Carboidratos solúveis totais e amido	41
3.6 Análises Estatísticas	41
4 RESULTADOS	42
4.1 Concentração de elementos em folhas e grãos	42
4.2 Experimentos de estresse por calor em espécies do gênero <i>Oryza</i>	47
4.2.1 Crescimento de acessos e genótipos sob estresse por calor	47
4.2.2 Parâmetros fotossintéticos	50
4.2.3 Extração de RNA e Construção das Bibliotecas para RNAseq	55
4.2.4 Concentrações de amido e carboidratos solúveis totais e peso de massa fresca e seca	56
5 DISCUSSÃO	58
6 CONCLUSÕES	66

7 PERSPECTIVAS FUTURAS.....	67
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68

1. INTRODUÇÃO

1.1 O aquecimento global e a segurança alimentar mundial

O aquecimento global é definido como um aumento da temperatura média da superfície da Terra, podendo ser atribuído à presença de um nível elevado na concentração de gases do efeito estufa (GEE), como o vapor de água ($\text{H}_2\text{O}_{\text{vapor}}$), metano (CH_4), ozônio (O_3), dióxido de carbono (CO_2), clorofluorcarbonetos (CFCs) e óxido nitroso (N_2O), na atmosfera (Al-Ghussain 2019). O efeito estufa é um processo natural que ao longo das eras geológicas constituiu um dos fatores mais importantes para o surgimento de vida na Terra. Este processo se inicia a partir da incidência da radiação solar na superfície terrestre ao longo do dia, em comprimentos de onda que se concentram entre as faixas do ultravioleta (UV; 0,2-0,4 μm), visível (0,4-0,7 μm) e em regiões próximas ao infravermelho (IV; > 0,7 μm). À medida que a superfície da Terra e os objetos se aquecem por condução, eles acabam irradiando radiação infravermelha de ondas longas em direção à atmosfera, que, em parte, será absorvida pelos GEE ou novamente irradiada em direção a superfície, retendo assim grandes quantidades de energia junto às camadas de ar próximas ao solo (Kweku *et al.*, 2018). Os GEE têm a capacidade de absorver e redirecionar a radiação infravermelha devido ao modo vibracional interno que seus átomos possuem, ao contrário dos outros componentes da atmosfera (Oktyabrskiy, 2016; Al-Ghussain, 2019). Como resultado, as temperaturas, especialmente as noturnas, tornam-se mais altas na superfície (Trenberth and Fasullo, 2009). O vapor de água é responsável por dois terços do efeito estufa terrestre, sendo a quantidade de aquecimento adicional na atmosfera fortemente influenciada pela quantidade de vapor de água adicionada ao sistema, devido ao aumento das concentrações de outros GEE, em especial pela emissão de CO_2 (Al-Ghussain, 2019).

Nos últimos 250 anos, os seres humanos aumentaram artificialmente a concentração de gases de efeito estufa na atmosfera, principalmente através da queima de combustíveis fósseis. Contudo, o aumento de CO₂ também se dá por outras vias, como a degradação de ecossistemas aquáticos e terrestres que reduz a absorção do carbono atmosférico. O segundo maior contribuinte antropogênico ao aquecimento global é o metano, um produto natural da digestão anaeróbica da matéria orgânica e que resulta na produção de gás natural. A concentração de metano na atmosfera também vem sendo aumentada por diversas atividades antrópicas, como, por exemplo, pela produção de animais ruminantes, pelos campos alagados de plantio de arroz, além do depósito de matéria orgânica em lixões e aterros sanitários (Zuberi and Ali, 2015; Kweku et al., 2018). Desde o início da Revolução Industrial no século XVIII, estima-se que os níveis de CO₂ tenham aumentado em cerca de 60%, enquanto os níveis de CH₄ aumentaram 148% (Riebeek, 2010).

Ao longo das últimas décadas, em especial nas últimas três, um progressivo aquecimento vem sendo registrado, sendo o período de 1983 a 2012, provavelmente o mais quente dos últimos 1400 anos no Hemisfério Norte. Os dados combinados da superfície terrestre e oceânica apresentam uma forte tendência de aquecimento global, de 0,85 °C, no período de 1880 a 2012 (IPCC, 2014). Devido à gravidade das possíveis consequências socioambientais associadas a este processo, a Convenção-Quadro das Nações Unidas sobre Mudanças Climáticas (UNFCCC, do inglês, *United Nations Framework Convention for Climate Change*) estabeleceu como meta que o aumento da temperatura média global deveria permanecer abaixo de 2 °C dos níveis pré-industriais. O Acordo de Paris, em 2015, redefiniu esse objetivo para, em um longo prazo, manter o aumento abaixo de 2 °C e estimular esforços para limitá-lo a 1,5 °C (Rogelj *et al.*, 2018).

Até o momento, a elevação da temperatura global já resultou em profundas alterações climáticas, incluindo o aumento da frequência e intensidade de eventos de seca, inundações, ondas de calor, mudanças nos padrões de precipitação, aumento no nível do mar, aumento da acidificação dos oceanos e perda de biodiversidade (Allen *et al.*, 2018). Existem evidências crescentes que apoiam a visão de que as mudanças climáticas aumentam o risco de incêndios florestais, com a associação de eventos de altas temperaturas e condições de seca, aumentando a incidência e intensificação das estações de incêndios (Keeley *et al.*, 2019), como evidenciados recentemente na Califórnia (Ban *et al.*, 2020) e na Austrália (Yu *et al.*, 2020).

Atualmente, as ondas de calor afetam aproximadamente 10% da Terra e podem atingir 17% em uma década, se o aquecimento continuar nos níveis atuais (Al-Ghussain, 2019). Análises de modelos múltiplos considerando um aumento da temperatura em 2 °C acima daquela encontrada no período pré-industrial demonstram que o número de dias quentes seguidos tenderão a ser mais frequentes e ininterruptos (Pfleiderer *et al.*, 2019). Além dessa mudança dinâmica, esses períodos quentes se tornarão mais intensos devido a um aumento puramente termodinâmico na temperatura média global. A ocorrência de eventos de temperaturas extremas deverá ocorrer em quase todos os locais e regiões, tanto em terra quanto em oceano (Hoegh-Guldberg *et al.*, 2018).

Estudos diversos tentam projetar os impactos do aumento da temperatura em várias partes do mundo. Na Índia, a presença de chuvas fortes e ondas de calor tem ocorrido com mais frequência nos últimos anos, na China as temperaturas do verão deverão aumentar de 1,2 a 9 °C até o final do século. Regiões tropicais como a do sudeste asiático deverão presenciar reduções na produção local, especialmente para culturas como milho e trigo (Yaduvanshi *et al.*, 2019). Estima-se que o aquecimento global altere substancialmente os sistemas climáticos e altere a produção global de alimentos, oferecendo riscos para segurança alimentar global e o desenvolvimento sustentável. A extensão dos impactos irá depender não apenas da intensidade e da periodicidade com que ocorrerem, mas também da combinação de ambos (FAO, 2018).

Análises de Ray *et al.* (2019), demonstram que as recentes mudanças climáticas geralmente estão associadas à diminuição nos rendimentos de culturas agrícolas na Europa, África Subsaariana e Austrália, e um aumento nos rendimentos na América Latina e respostas variadas na América do Norte e Central e na Ásia. Estudos utilizando modelos e simulações do rendimento de culturas sob os efeitos das mudanças climáticas sugerem que a produtividade das principais culturas como milho, trigo, arroz e soja serão afetadas substancialmente, devido ao crescimento e desenvolvimento dessas culturas ser principalmente dependente da luz solar, temperaturas ideais e disponibilidade hídrica (Ahmed *et al.*, 2019). Dessa maneira, a diminuição na produtividade agrícola causada pelas alterações climáticas poderá gerar mudanças no padrão de consumo calórico, de forma direta ou indireta, na população. Estudos envolvendo 53 países com índices de fome grave, alarmante ou seriamente alarmante, realizado em 2008, demonstrou que cerca de 27 países haviam diminuído o consumo de calorias devido às mudanças climáticas, ocorridas até

aquele momento. As maiores perdas foram evidenciadas na parte sul do continente africano (como Zimbábue, Malawi, Moçambique), na África ocidental (Mali, Gana) e na Ásia (Índia e Nepal). Contudo, os resultados não abordavam sobre o acesso a alimentos, nutrição e outros componentes da segurança alimentar, mas sugere que as mudanças climáticas podem aumentar o risco na insegurança alimentar (Ray *et al.*, 2019).

As mudanças climáticas exercem efeitos negativos na produtividade de culturas através de alterações nos padrões e distribuição das chuvas, aumento da frequência de ondas de calor e seca, prejudicando assim a produção e rendimento de grãos (Ahmed *et al.*, 2019). A adaptação às mudanças climáticas nos sistemas agrícolas pode acarretar mudanças nas práticas agrônômicas como a expansão dos processos de irrigação, alternância nas datas de plantio das culturas e mudanças na distribuição geográfica das culturas (Ray *et al.*, 2019; Sloat *et al.*, 2020). Os avanços advindos da biotecnologia, incluindo o progresso em genômica e tecnologia da informação, podem mitigar os efeitos prejudiciais causados pelas mudanças climáticas através da seleção e desenvolvimento de cultivares que permitem o cultivo bem-sucedido de culturas sob diferentes condições ambientais (Lamaoui *et al.*, 2018).

1.2 Impacto molecular, celular e fisiológico do estresse por calor em plantas

Estresses abióticos são usualmente inter-relacionados, pois tanto individualmente quanto em combinação causam mudanças morfológicas, fisiológicas, bioquímicas e moleculares que afetam de maneira negativa o crescimento e a produtividade da planta. Os estresses provocados por alta temperatura, seca e salinidade estão entre os estresses abióticos que mais causam danos em espécies de plantas, incluindo as cultivadas (Bita and Gerats, 2013). O estresse por calor é usualmente definido como a elevação da temperatura a níveis acima do ótimo, e com duração suficiente para causar danos irreversíveis ao crescimento e desenvolvimento da planta (Hall, 2000). A sensibilidade das plantas pode variar entre diferentes espécies e, algumas vezes, até mesmo dentro de uma mesma espécie em diferentes estágios de desenvolvimento e órgãos (Röth *et al.*, 2016). Em geral, uma elevação transiente na temperatura, na faixa de 10-15 °C acima do ambiente é considerado choque térmico ou estresse por calor (Hall, 2000).

Entre os diversos efeitos causados pela exposição das plantas à alta temperatura estão: redução na taxa de germinação, inibição do crescimento da raiz e parte aérea, queima das folhas e caules, abscisão foliar, senescência, esterilidade floral e/ou dano dos frutos, e consequente perda de produtividade (Hasanuzzaman *et al.*, 2013; Sharma *et al.*, 2020). Em muitos casos, a arquitetura da planta é modificada pelo crescimento de hipocótilos e pecíolos, resposta morfológica semelhante ao “evitamento da sombra” (Ruberti *et al.*, 2012). No entanto, o calor reduz o crescimento das plantas afetando a taxa de assimilação líquida da parte aérea e, portanto, o peso seco total da planta (Wahid, 2007). Causando um prejuízo em processos fundamentais como o de assimilação de nutrientes, fotossíntese, e síntese/consumo de carboidratos (Yuan *et al.*, 2017). Em condições em que o estresse por alta temperatura se torna extremo, as plantas podem desencadear a morte celular programada em determinados tecidos e/ou células, dependendo da intensidade de desnaturação ou agregação de proteínas, o que pode levar desde minutos até mesmo segundos (Hasanuzzaman *et al.*, 2013).

Alguns exemplos de efeitos do estresse por calor, em diferentes espécies de plantas, são discutidos a seguir. Diversos trabalhos destacam o impacto negativo do estresse por alta temperatura no número de espigas/ panículas formadas, no preenchimento e peso de grãos em *Triticum aestivum* L. (Balla *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2018; Aiqing *et al.*, 2018) e *Oryza sativa* L. (Pansarakham *et al.*, 2018). Em *Zea mays* L. a exposição às temperaturas de 38/30 °C dia/noite levou à redução no desenvolvimento e produção de grãos (Hussain *et al.*, 2019). Durante a exposição a temperatura de 45 °C por 24h, plantas de arroz tiveram uma redução no crescimento e desenvolvimento das folhas, em comparação com plantas controles mantidas a 27 °C (Scafaro *et al.*, 2010). Embora plantas de arroz ainda consigam manter seu crescimento normal e sem reduções significativas no rendimento de grãos com variações na temperatura de 27 a 32 °C, em temperaturas acima de 32 °C, todos os estágios de crescimento e desenvolvimento são afetados negativamente (Aghamolki *et al.*, 2014). Resultados similares foram evidenciados por Kilasi *et al.* (2018), onde a exposição de plantas de arroz à 37 °C gerou uma redução de 36 e 46% no crescimento de brotos e raízes quando comparadas com plantas controle.

Além dos efeitos na produtividade em culturas, efeitos fisiológicos evidentes em plantas de morangos (*Fragaria x ananassa* Duch.) foram observados quando expostos a temperaturas altas, resultando em uma diminuição no crescimento da planta e dos frutos

(Wang and Camp, 2000). Em folhas de *Solanum tuberosum* L., há uma redução no crescimento, teor de clorofila, conteúdo relativo de água e um aumento na concentração de prolina e açúcares solúveis (Naz *et al.*, 2018). Um estudo realizado com tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) demonstrou que o calor inibe o crescimento da planta, e promove o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ERO) que, por sua vez, aceleram a floração e a senescência (Yang *et al.*, 2018). As altas temperaturas também induzem hiponastia, alteração na estrutura foliar e redução de crescimento em *Arabidopsis thaliana* (Vile *et al.*, 2012; Vasseur *et al.*, 2011), como resultado de um desequilíbrio no balanço de carbono na planta, com redução no teor de açúcar solúvel e amido (Vasseur *et al.*, 2011). Em *Arabidopsis*, o estresse por calor pode desencadear um tipo de morte celular oxidativa dependente de ferro, com semelhanças morfológicas e bioquímicas com a ferroptose, encontrada em animais (Distéfano *et al.*, 2017).

1.2.1 Aspectos moleculares da resposta ao estresse por calor em plantas

Cerca de 5% do transcriptoma da planta é regulado de forma positiva, causando aumento na expressão gênica de até duas vezes ou mais em resposta ao estresse por calor, sendo que apenas uma pequena fração destas codificam chaperonas (Mittler *et al.*, 2012). As chaperonas podem exercer diversas funções celulares com base em sua natureza molecular e estrutural, atuando no auxílio e manutenção de dobramentos proteicos e processos de ubiquitinação (Mayer, 2010). Dentre as chaperonas codificadas pelo estresse por calor, as HSPs (*heat shock proteins*) são conhecidas por atuarem na estabilização de membranas e proteínas, aliviando assim os danos causados pelo estresse (Liu *et al.*, 2020). Em plantas, as HSPs são agrupadas em famílias de acordo com o seu peso molecular aproximado, sendo classificadas como HSP100, HSP90, HSP70, HSP60 e pequenas HSPs (sHSPs), também chamadas de HSP20 (Al-Whaibi, 2011; Khan and Shahwar, 2020).

Dentre as diversas classes de HSPs relatadas em plantas, as sHSPs estão entre as mais encontradas (Banerjee and Roychoudhury, 2018). Embora as sHSPs estejam presentes em todos os reinos da vida, elas são exclusivamente diversas em plantas terrestres, com 11 ou mais famílias gênicas encontradas em monocotiledôneas e eudicotiledôneas (Waters, 2013). As sHSPs se distinguem por sequências conservadas características e distintas localizações subcelulares. São encontradas em praticamente todos os compartimentos celulares, como em

cloroplastos, mitocôndrias, citosol, retículo endoplasmático, peroxissomo e núcleo (Banerjee and Roychoudhury, 2018). As sHSPs se ligam a proteínas-alvos e as mantêm em um estado competente de redobramento, evitando assim a sua agregação (Basha *et al.*, 2013). O termo “pequenas” faz referência ao tamanho monomérico dessas proteínas, as quais podem variar entre 12-42 kDa, embora muitas sHSPs possam formar grande oligômeros com até 40 a 50 subunidades (Muthusamy *et al.*, 2017). Em plantas superiores, duas classes de sHSPs citosólicas, classe I e II, foram caracterizadas como abundantes durante o estresse térmico (McLoughlin *et al.*, 2016).

Durante a exposição ao calor, os fatores de transcrição de estresse térmico HSFs (*heat shock transcription factors*) atuam como os principais reguladores da resposta ao estresse através da modulação e ativação da expressão gênica de *HSPs* (Guo *et al.*, 2016; Al-Wahaibi, 2011). Os HSFs são ativados de forma rápida aumentando assim a expressão de muitos genes responsivos que codificam HSPs (Ohama *et al.*, 2016). Os HSFs apresentam variabilidade em tamanho e sequências, mas sua estrutura básica e o modo de reconhecimento do promotor são conservados em todo o reino eucariótico (Scharf *et al.*, 2012). Os HSFs apresentam domínio de ligação ao DNA (DBD) e regiões de repetições hidrofóbicas, essas repetições agrupam-se em conformações triméricas ativas em resposta a fatores de estresse (Åkerfelt *et al.*, 2010). Nos eucariotos, as conformações trimerizadas se ligam a elementos cis de choque térmico (HSE) conservados (GAAnnTTC) presentes nos promotores de genes induzíveis por calor (Liu and Charng, 2013; Ohama *et al.*, 2016).

A maioria dos HSFs são regulados pelo estresse térmico em plantas. No genoma de *A. thaliana*, cerca de 21 *HSFs* foram identificados, e em arroz 26, podendo ser divididas em HsfA, HsfB e HsfC (Mittler *et al.*, 2012; Kotak *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2016). Entre os vários membros da família HSFs em plantas superiores, os HSFs do tipo A1 e A2 desempenham papel fundamental na resposta ao estresse por calor (Wang *et al.*, 2016). O grupo A1 é composto por 4 membros, HsfA1a, HsfA1b, HsfA1d e HsfA1e (Ohama *et al.*, 2016). Em estudos realizados com mutantes triplo nocaute de *Arabidopsis* para *HsfA1(a/b/d)* verificou-se que a maioria dos genes responsivos ao estresse por calor não eram induzidos, sugerindo que HsfA1a, b, d atuam como reguladores principais na resposta ao estresse por calor (Liu *et al.*, 2011; Yoshida *et al.*, 2011). Plantas quadruplo nocaute (*HsfA1a, b, d, e*) além de exibir uma redução de 65% na regulação positiva de genes essenciais na termotolerância, apresentavam também alterações morfológicas e retardo no crescimento,

indicando que as HsfA1 atuam na resposta ao estresse térmico e também no crescimento e desenvolvimento (Liu *et al.*, 2011).

Durante a exposição das plantas ao estresse térmico, o HsfA1 não apenas induz a expressão de HSPs, mas também de fatores de transcrição que desencadeiam uma cascata transcricional induzindo *HsfAs*, *HsfBs*, *DREB2A* (*dehydration-responsive element-binding protein 2A*) e *MBF1c* (*multiprotein bridging factor 1c*) (Liu *et al.*, 2011; (Yoshida *et al.*, 2011; Liu and Charng, 2013). Em protoplastos de tabacco expressando HSFs de tomate observou-se que a importação nuclear da HsfA2 requer a interação com HsfA1a, levando à formação de um complexo hetero-oligomérico que pode ativar sinergicamente a expressão de *sHSPs* (Chan-Schamnet *et al.*, 2009). Experimentos em *Arabidopsis* realizados por Liu and Charng (2013), demonstraram que sob estresse por calor, HsfA2 exerce maior atividade do que HsfA1s durante o processo de ativação de genes responsivos na homeostase redox e de metabolismo de lipídios e carboidratos. Semelhante a HsfA1, o aumento nos níveis de HsfA2 ocasiona um aumento na regulação de um grande número de chaperonas e co-chaperonas. Em arroz, OsHsfA2 (a, b, c, d, e) que atuam de forma semelhante na resposta ao calor. Porém quando superexpressos, apenas HsfA2e ocasiona um aumento na termotolerância (Yokotani *et al.*, 2008). Sob estresse por calor em arroz, HsfA2 é altamente induzida em raiz, caule, panículas e sementes, enquanto HsfA7 e A9 são induzidas somente em panícula e sementes (Chauhan *et al.*, 2011). Em plantas de trigo sob estresse por calor, verificou-se um aumento na expressão de HsfA2 e HsfA6 (Xue *et al.*, 2015).

1.2.2 Sinalização celular do estresse por calor em plantas

A detecção e sinalização do estresse por calor em plantas foi recentemente revisado por Sharma *et al.*, (2020b). A membrana plasmática (MP) e o retículo endoplasmático (RE) participam ativamente da resposta ao estresse térmico em plantas. Altas temperaturas levam ao aumento da fluidez de membrana, alteração da sua composição lipídica e também função (Lamers *et al.*, 2020). O aumento da fluidez de membrana induz a ativação de cascatas de sinalização que promovem a liberação de cálcio do RE e também um aumento do influxo de Ca^{2+} pelos canais localizados na MP (Mittler *et al.*, 2012). Dentro da célula, o Ca^{2+} livre ativa CaM3 (*calmodulins*) e múltiplas CDPKs (*calcium-dependent protein kinases*) (Sajid *et al.*, 2018). A proteína CaM3 está envolvida na ativação de diferentes fatores de transcrição

como WRKY39 (Li *et al.*, 2010) e HSFs (Liu *et al.*, 2011). As CDPKs podem ativar múltiplas MAPKs (*mitogen-activated protein kinases*) ou a enzima produtora de espécies reativas de oxigênio (ERO) NADPH-oxidase localizada na MP (Suzuki *et al.*, 2011). As MAPKs (MAPK3 e 6) possuem um papel crucial na resposta à alta temperatura pela regulação da expressão de HsfA2 e de HSPs (Wang and Huang, 2017).

As ERO derivadas da NADPH oxidase de membrana, acumuladas no apoplasto, podem causar despolarização de membrana, como também entrar na célula e ativar a cascata de sinalização dependente de ERO que vai ativar MBF1c e HSFs. As ERO também podem acumular nas células durante o estresse por calor, devido a um desbalanço metabólico, e desencadear o mesmo processo (Mittler *et al.*, 2012). As CDPKs são ainda ativadas por MBF1c, que atua como co-ativador para estimular a expressão de enzimas antioxidantes sob estresse térmico (Qu *et al.*, 2013). Todos os genes ativados atuam a jusante da cascata de sinalização por Ca^{2+} , a qual constitui um passo chave na expressão de HSFs e HSPs sob estresse térmico (Sajid *et al.*, 2018). Dentro do núcleo, o HsfA2c ativado por Ca^{2+} ou MAPK estimulam a expressão de genes HSP como Hsp18, Hsp70 e Hsp90 (Wang and Huang, 2017).

Adicionalmente, o mecanismo por trás da tolerância ao estresse pelo RE é conhecido como resposta de proteína desdobrada ou UPR (*unfolded protein response*), e envolve a identificação de proteínas desdobradas ou mal dobradas acumuladas no lúmen do RE e a ativação de fatores de transcrição, foldases e chaperonas visando restaurar a função normal da célula (Sharma *et al.*, 2020b). As plantas possuem duas rotas primárias desta resposta. Uma via é iniciada por fatores de transcrição ligados à membrana como bZIP17 e 18 (*basic leucine zipper*), e outra inclui o fator de splicing de RNA IRE1 (*inositol-requiring enzyme 1*) (Liu and Howell, 2016).

1.2.3 Inibição da fotossíntese no estresse por calor em plantas

O estresse térmico induz mudanças na fotossíntese que levam a um ciclo de vida mais curto e à menor produtividade da planta (Bitá and Gerats, 2013), sendo este processo mais evidente em plantas C3 do que em plantas C4 (Hasanuzzaman *et al.*, 2013). Ocorrendo nos cloroplastos, a fotossíntese é observada como um processo fotoquímico sensível a diferentes regimes de temperaturas, onde estresses leves demonstram menos efeitos danosos quando

comparados a estresses severos que podem comprometer todo o seu funcionamento (Sharma *et al.*, 2020a); Wang *et al.*, 2018). A exposição às altas temperaturas, bem como outros estresses como seca, salinidade, excesso de luminosidade e metais pesados afetam diretamente diversos componentes do maquinário fotossintético como do fotossistema I e II (PSI e PSII) e pigmentos fotossintéticos, como também afetam processos essenciais na geração de ATP e assimilação de carbono (Allakhverdiev *et al.*, 2007; Sharma *et al.*, 2020a).

O PSII participa de um supercomplexo proteico com múltiplas subunidades. Nas plantas superiores, esse supercomplexo possui dois centros de reação completos, que abrigam em sua maior parte cofatores responsáveis pelo transporte de elétrons, e alguns complexos antena (*light-harvesting complex II*, LHCII), formados em maior número por pigmentos fotossintéticos (Dikilitas *et al.*, 2019). O PSII-LHCII é composto por um dímero D1-D2 (PsbA-PsbD) juntamente com duas proteínas antena, proteínas associadas às clorofilas (CPs) CP43 e CP47 e três proteínas menores CP24, CP26 e CP29 (Gururani *et al.*, 2015). O transporte de elétrons na fotossíntese inicia no PSII devido a sua capacidade única de desidrogenação das moléculas de H₂O no complexo de produção de oxigênio (*oxygen-evolving complex*, OEC). No OEC, moléculas de água são quebradas produzindo prótons (H⁺), que são liberados no lume do tilacóide e vão contribuir para a formação do gradiente eletroquímico de prótons para geração de ATP e O₂. Os elétrons originados da quebra d'água são transferidos ao PSI através da cadeia transportadora de elétrons (*electron transport chain*, ETC). No PSI, moléculas de clorofila ligadas ao centro de reação atuam na captação luminosa juntamente com as proteínas do LHCI. A composição do complexo antena do PSI e II são distintas, sendo o LHCII composto principalmente pela clorofila B e o LHCI pela clorofila A. O PSI reduz o NADP⁺ a NADPH no estroma, pela ação da ferredoxina (Fd) e da flavoproteína ferredoxina-NADP⁺ redutase (FNR). O NADPH é utilizado no ciclo de Calvin-Benson para reduzir o CO₂ (Gururani *et al.*, 2015; Koochak *et al.*, 2019; Takahashi and Murata, 2008).

O fotodano ao PSII é uma reação muito usual nos organismos que realizam fotossíntese (Koochak *et al.*, 2019). Para prevenir o acúmulo de PSII danificado, os organismos fotossintéticos desenvolveram um processo de reparo que consiste na degradação proteolítica das proteínas D1, síntese da proteína precursora de D1 (pré-D1), inserção do precursor recém-sintetizado na membrana tilacóide concomitantemente com a montagem de outras proteínas do PSII, maturação da proteína D1 através do processamento

da região C-terminal de pré-D1, e finalmente, montagem da maquinaria do complexo produtor de oxigênio. A fotoinibição é resultado do balanço entre a taxa de fotodano do PSII e a taxa de reparo. Os estresses ambientais não afetam diretamente a fotoinibição, mas facilitam a inibição do reparo do PSII (Takahashi and Murata, 2008; Gururani *et al.*, 2015).

O ciclo de Calvin-Benson é responsável pela fixação de CO₂ em carboidratos, assim como a assimilação, transporte e utilização de fotoassimilados (Wang *et al.*, 2018a). A principal enzima responsável pela fixação de CO₂ é a ribulose 1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase (rubisco) (Sharma *et al.* 2020a). A rubisco ativase (RCA) é responsável pela regulação da atividade da rubisco, atuando na dissociação de fosfatos de açúcares que inibem o local ativo da rubisco de maneira dependente de ATP. Quando exposta ao estresse térmico, a atividade de RCA é inibida resultando na inativação da Rubisco (Wang *et al.*, 2018a). Adicionalmente, a medida que a temperatura aumenta, a atividade carboxilase da rubisco diminui, enquanto sua atividade oxigenase aumenta resultando no aumento da fotorrespiração. Com a diminuição da atividade da rubisco, há uma diminuição no consumo de NADPH, levando a redução dos níveis de NADP⁺, o qual é um dos principais aceptores de elétrons do PSI. Esses fatores promovem a interrupção da fixação de CO₂ e causam a produção acelerada de H₂O₂ (Hu *et al.*, 2020; Takahashi and Murata, 2008). Com a falta dos aceptores de elétrons, os elétrons energizados são convertidos a superóxido (O₂⁻) através da reação de Mehler, o O₂⁻ é reduzido pela ação da enzima superóxido dismutase (SOD) que o converte em peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Se as enzimas que atuam na redução de danos oxidativos como catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX) e glutathiona peroxidase (GPX) não conseguem retirar o excesso de ERO do sistema pode ocorrer vários danos que vão afetar a fotossíntese, tais como, peroxidação lipídica, oxidação de proteínas e danos na tradução do mRNA de PsbA, causando a inativação do processo de reparo do PSII (Allakhverdiev *et al.*, 2008; Gururani *et al.*, 2015; Dikilitas *et al.*, 2019; Takahashi and Murata, 2008).

1.2.4 Metabólitos primários e secundários na resposta ao estresse por calor em plantas

A homeostase em geral, incluindo a biossíntese e a compartimentalização de metabolitos, é afetada pela alta temperatura (Bita and Geralts, 2013). A alta temperatura modifica a atividade de enzimas do metabolismo do carbono, o acúmulo de amido e a síntese

de sacarose, por regular negativamente genes específicos do metabolismo de carboidratos (Ruan *et al.*, 2010; Bitá and Geralts, 2013). Os açúcares solúveis, além da função de recurso metabólico e constituinte estrutural, atuam como sinais regulatórios em vários processos relacionados ao crescimento e desenvolvimento vegetal (Röth *et al.*, 2016; Ruan *et al.*, 2010). Plantas mutantes ou culturas que exibem maior termotolerância apresentam alterações nos níveis de açúcares de diferentes classes, geralmente apresentando um aumento nos níveis desses compostos (Röth *et al.*, 2016).

Um dos mecanismos de resposta ao estresse nas plantas mais documentados é a síntese e o acúmulo de solutos compatíveis. Os metabólitos primários são compostos orgânicos, solúveis em água e impermeáveis à membrana que podem acumular em altas concentrações no citoplasma, dependendo da resposta ao estresse (Hasanuzzaman *et al.*, 2019). Algumas moléculas do metabolismo primário com função osmoprotetora possuem papel vital na adaptação das plantas aos estresses abióticos, o que inclui a exposição a altas temperaturas (Xalxo *et al.*, 2020). Dentre os osmólitos produzidos por diferentes espécies de plantas estão, açúcares, álcoois de açúcar (polióis), prolina, glicina betaína, compostos de amônio terciário e quaternário e compostos de sulfônico terciário (Wahid *et al.*, 2007; Xalxo *et al.*, 2020). Esses osmoprotetores têm funções de amplo espectro, incluindo eliminação de ERO, equilíbrio do estado redox celular, ação osmoprotetora, estabilização do pH citosólico, de proteínas, enzimas e membranas, além de atuarem como uma fonte potencial de carbono e nitrogênio para plantas durante eventos de estresse e os episódios de recuperação subsequentes (Hasanuzzaman *et al.*, 2019).

A prolina, um aminoácido derivado da glicose, é um osmólito considerado compatível com o funcionamento celular mesmo quando em concentrações elevadas, podendo atuar também como molécula sinalizadora (Sharma *et al.*, 2020b; Röth *et al.*, 2016). Entre suas funções, ela previne a agregação proteica e estabiliza a enzima M4 lactato desidrogenase durante a exposição a temperaturas extremas (Murmu *et al.*, 2017). Diversos estudos têm atribuído características antioxidantes à prolina, os quais sugerem uma atividade sequestrante de ERO (Murmu *et al.*, 2017). Em trabalho de revisão, Surabhi and Seth (2020) descrevem que o acúmulo de prolina ocorre em diferentes plantas quando submetidas ao estresse por calor, como em milho (Kumar, 2012), tabaco (Cvikrová *et al.*, 2012), melancia (da Silva *et al.*, 2018), feijão-fava (*Vicia faba*) (Alamri *et al.*, 2019), feijão indiano (*Vigna aconitifolia*) (Harsh *et al.*, 2016) e feijão (*Phaseolus vulgaris*) (Chavez-Arias *et al.*, 2018).

Contudo, não foram observados acúmulos de prolina em *Arabidopsis* (Rizhsky *et al.*, 2004), enquanto uma breve redução foi observada na germinação de sementes de trigo sob estresse por calor (Kaushal *et al.*, 2016).

A glicina betaína (GB) é uma amina quaternária anfotérica que atua como soluto compatível em plantas sob diversos estresses. Seu acúmulo natural está associado à tolerância a estresses abióticos (Wahid *et al.*, 2007; Giri, 2011). Níveis de acúmulo de GB variam consideravelmente entre espécies e órgãos das plantas (Chen and Murata, 2011). A GB atua na estabilidade da atividade estrutural de complexos proteicos e enzimáticos, auxiliando na manutenção e integridade da membrana contra impactos inibitórios causados por estresses salinos e térmicos (Sharma *et al.*, 2020b). Plantas de tabaco superexpressando o gene betaína aldeído desidrogenase (BADH) de espinafre tiveram um aumento na taxa de assimilação de CO₂, quando comparadas com plantas não transgênicas. Esse acúmulo de GB previne a captura da Rubisco ativase na membrana tilacoidal, mantendo assim, a sua atividade sob estresse por calor (Yang *et al.*, 2005). Além disso, foi descoberto que o acúmulo de GB previne a inibição da taxa fotossintética líquida sob estresse térmico. A biossíntese de GB é amplamente utilizada para fins de melhoramento de plantas sob estresses abióticos (Giri, 2011). Plantas de trigo superexpressando o gene BADH de *Atriplex hortensis* L. acumularam uma grande quantidade de GB levando a um aumento na fotossíntese não apenas sob estresses de seca e calor de formas individuais, mas também sob a combinação de ambos quando comparados com plantas controle. O aumento da atividade antioxidante e melhoras no status de água podem ser mecanismos subjacentes ao aumento da fotossíntese pela GB em plantas de trigo (Wang *et al.*, 2010).

O ácido γ -4-aminobutírico (GABA) é um aminoácido não proteico. Sua concentração é regulada para ativar genes relacionados à tolerância a estresses, incluindo estresse térmico (Sharma *et al.*, 2020b; Priya *et al.*, 2019). GABA tem sido implicado no funcionamento das células vegetais estando envolvido em processos de sinalização e osmoregulação, metabolismo do C e N, e na regulação do pH citosólico e proteção ao estresse oxidativo (Sharma *et al.*, 2020b; Priya *et al.*, 2019). Sob estresses, como seca e térmico, o tratamento com GABA pode influenciar o crescimento, a fisiologia e diversas respostas bioquímicas de forma positiva (Sharma *et al.*, 2020b). A aplicação exógena de 1mM de GABA em plântulas de arroz submetidas a diferentes regimes de temperaturas (35 e 42 °C) melhorou de forma significativa o crescimento de parte aérea e raiz quando comparada com plantas não tratadas.

O aumento no conteúdo relativo de água nas folhas e a condutância estomática foram associados ao aumento no acúmulo de osmólitos como prolina e trealose, enquanto baixos danos causados por ROS foram atribuídos aos níveis aumentados de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos (Nayyar *et al.*, 2014).

As plantas acumulam poliaminas (PAs) em vários órgãos durante os diferentes estágios de desenvolvimento e quando expostas a condições de estresse abiótico (Sharma *et al.*, 2020b; Mostofa *et al.*, 2014). Três principais tipos de PAs ocorrem de forma abundante em espécies vegetais, sendo elas, Putrescina (Put), Espermidina (Spd) e Espermina (Spm), além destas principais, outras como homospermina e cadaverina também são encontradas em algumas plantas (Sengupta *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2019; Mostofa *et al.*, 2014). A atividade biológica das PAs é atribuída à sua natureza catiônica, o que facilita a ligação com biomoléculas com carga negativa, como DNA, RNA, proteínas e fosfolipídios (Sharma *et al.*, 2020b). A Put, a qual contém dois grupamentos amino, é o produto principal da via biossintética de PAs e é precursora sintética de Spd e Spm. Sob altas temperaturas, a aplicação exógena de Spd em plântulas de arroz ocasionou uma redução dos danos induzidos pelo estresse e um aumento na atividade de enzimas antioxidantes e dos níveis de antioxidantes (Mostofa *et al.*, 2014). Resultados semelhantes foram encontrados em trigo onde a aplicação de Smd e Spd resultou em um aumento no peso de grãos e na atividade de enzimas antioxidantes (Jing *et al.*, 2020). A aplicação exógena foliar de 1mM de Spd em plântulas de pepino (*Cucumis sativus*) submetidas a estresse por calor, ocasionou um aumento na atividade de enzimas antioxidantes neutralizando o dano oxidativo (Tian *et al.*, 2012). Em tomates (*Lycopersicon esculentum*), a aplicação de 1mM de Spd induziu a termotolerância através do aumento na expressão de genes de biossínteses de PAs, ao mesmo tempo que induzia a expressão de genes relacionados a etileno e genes de vias hormonais (Cheng *et al.*, 2012). Em plantas de trigo, a aplicação de exógena de 10mM de Put causou um aumento nas atividades de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos seguido por uma redução na peroxidação lipídica de raízes e brotos quando cultivadas sob estresse por calor (Asthir *et al.*, 2012).

Os metabólitos secundários são compostos orgânicos de baixo peso molecular e não possuem atividade ligada diretamente ao crescimento, desenvolvimento ou reprodução (Bartwal *et al.*, 2013). Existem três grupos principais de metabólitos secundários em plantas, com base na via biossintética, os grupos são classificados em compostos nitrogenados

(glicosídeos, cianogênicos, alcaloides e glucosinolatos), compostos fenólicos (flavonoides e fenilpropanóides) e terpenos (isoprenoides) (Ashraf *et al.*, 2018). Para a maioria das plantas, fatores externos ou variáveis como temperatura, luz, salinidade, fertilidade do solo, entre outros, podem afetar alguns processos associados à capacidade de sintetizar metabólitos secundários (Bartwal *et al.*, 2013). Essas mudanças eventualmente levam a alterações nos perfis fitoquímicos que atuam de forma estratégica na produção de substâncias bioativas. Essa capacidade de síntese pode ser gradualmente modulada em função aos estímulos externos, possibilitando assim a adaptação e sobrevivência à ambientes em transição (Yang *et al.*, 2018). Os metabólitos secundários podem ser produzidos como subprodutos ou intermediários do metabolismo primário, e atuar na tolerância a estresses através do fornecimento de substâncias que desintoxicam ERRO (Shahid *et al.*, 2017).

Como uma das principais variáveis climáticas, altas temperaturas podem influenciar de forma significativa a composição e quantidades de metabólitos secundários em plantas (Yang *et al.*, 2018). Em estudos realizados por Zheng *et al.* (2012), a composição fenólica em três cultivares de groselha-preta (*Ribes nigrum*) apresentaram uma correlação positiva com a temperatura. O estresse de alta temperatura induz a produção de compostos fenólicos, em tomates. O estresse por calor resultou em um acúmulo de compostos fenólicos solúveis, aumento da atividade fenilalanina amonialiase que é a principal enzima da via fenilpropanóide e a diminuição da atividade de peroxidase e polifenol oxidase (Rivero *et al.*, 2001). O aumento nos níveis de fenóis solúveis sugere que o aprimoramento da biossíntese e a redução da oxidação de compostos fenólicos é um mecanismo importante na aclimação ao estresse (Röth *et al.*, 2016). Foi demonstrado que a produção de poliaminas e a subsequente formação de fenilamidas ocorrem em plantas de feijão quando submetidas ao estresse térmico. Essa produção favorece a função de eliminação de ERO durante o estresse (Edreva *et al.*, 1998). Sob estresse por calor, ocorre um aumento no acúmulo de caratenóides da família xantofilas, as quais incluem violaxantina, anteraxantina e zeaxantina, dividindo-se entre os complexos de captação de luz e as membranas lipídicas dos tilacóides. Como resultado, ocorre uma diminuição da fluidez da membrana e diminui a suscetibilidade à peroxidação lipídica (Wahid *et al.*, 2007; Havaux, 1998).

1.3 Arroz

No cenário atual, a agricultura enfrenta diversos desafios, como a constante mudança na demanda global de alimento associada ao crescimento populacional, diminuição de terras aráveis e o aumento na frequência de eventos climáticos extremos (Paul *et al.*, 2020; Ahmed *et al.*, 2019). Estudos recentes estimam que com o aumento de 1 °C na temperatura, culturas como arroz, trigo e milho podem apresentar um declínio de 3 a 8% no rendimento das safras (Zhao *et al.*, 2017). As Nações Unidas projetam que a população mundial será de 9,7 bilhões em 2050, 10,8 bilhões em 2080 e 11,2 bilhões em 2100 (FAO, 2018). Esse aumento populacional ocorrerá de forma mais expressiva em regiões com maior densidade populacional e com índices alarmantes de pobreza, como no continente Africano e no sul da Ásia (Wing *et al.*, 2018).

O plantio de arroz ocupa cerca de um terço da área total de cultivo de cereais no mundo, sendo a maior parte da produção de arroz em regiões tropicais, apresentando uma grande importância no papel econômico e social de diversos países (Vinod, 2016; Moura and Landau, 2018). Embora existam diferentes sistemas de cultivo de arroz, o sistema de plantio irrigado responde por 55% da área produzida de arroz, produzindo 75% da produção de arroz global (Vinod, 2016). O continente Asiático é responsável por cerca de 90% do arroz cultivado e produzido no mundo, sendo a China e Índia os principais produtores (Fahad *et al.*, 2018). O Brasil ocupa a nona colocação como maior produtor mundial de arroz, com destaque ao estado do Rio Grande do Sul como maior produtor brasileiro (Moura and Landau, 2018).

O arroz é um dos cereais mais consumidos do mundo, sendo cultivado em praticamente todos os continentes, exceto na Antártica (Prasad *et al.*, 2017). É alimento básico na dieta de grande parte da população humana, onde cerca de 3,5 bilhões de habitantes dependem do arroz para obter 20% de sua ingestão calórica diária, motivo o qual é considerado a espécie que apresenta maior potencial no combate à fome mundial (Wing *et al.*, 2018; Fahad *et al.*, 2018). Apesar de sua importância como fonte de carboidratos, o grão de arroz apresenta baixas concentrações de nutrientes essenciais, dentre eles os micronutrientes ferro (Fe) e zinco (Zn), e pode acumular elementos tóxicos como cádmio (Cd) e arsênio (As) (Clemens and Ma, 2016; Ricachenevsky and Sperotto, 2016). Dentre os cereais, o arroz apresenta as concentrações mais baixas e a variabilidade genética mais

restrita para melhoramento convencional destas características (Kennedy and Burlingame, 2003; Pfeiffer and McClafferty, 2008).

Estima-se que dois bilhões de pessoas, principalmente crianças, mulheres grávidas e lactantes, sofram de desnutrição por micronutrientes (Descalsota *et al.*, 2018). Entre os cenários de insegurança alimentar, a região Sul da Ásia apresenta os maiores índices, com cerca de 262 milhões de pessoas desnutridas no mundo (Ahmed *et al.*, 2019). A Organização Mundial da Saúde (OMS) relatou que cerca de 25% da população mundial sofre de anemia, decorrida da deficiência de Fe (Wakeel *et al.*, 2018) e 17,3% tenha deficiência de Zn (Wessells *et al.*, 2012). A Organização das Nações Unidas (ONU) afirma que combater as deficiências de micronutrientes é um dos objetivos de desenvolvimento sustentável a ser alcançado até 2035 (Dalmiya and Schultink, 2003). O arroz é um candidato óbvio para estratégias de biofortificação considerando a importância do arroz como alimento básico da população e o impacto que o aumento de Fe e Zn nos grãos traria para a saúde humana. A biofortificação consiste na produção de variedades capazes de acumular quantidades maiores de nutrientes nas suas partes comestíveis, com impacto positivo na nutrição humana, de maneira que não seja necessário qualquer processamento ou adição *a posteriori* destes compostos (Sperotto *et al.*, 2012).

1.4 O gênero *Oryza*

O gênero *Oryza* é composto por 27 espécies com 11 tipos de genoma, seis diploides ($n=12$: AA, BB, CC, EE, FF e GG) e cinco poliploides ($n=24$: BBCC, CCDD, HHJJ, HHKK, KKLL) (Chen *et al.*, 2019). Os genomas podem variar em até 3,6 vezes no tamanho quando comparados entre si (Ricachenevsky and Sperotto, 2016). As espécies de arroz selvagens possuem populações mais heterogêneas quando comparadas com espécies cultivadas (Hamzelou *et al.*, 2020). Elas apresentam uma diversidade significativa em termos de características morfológicas como altura, número de perfilhamento, comportamento de floração, hábitos de crescimento, características de folha, panícula e semente, e estão adaptadas a diferentes habitats (Kumagai *et al.*, 2018). Essas espécies são um recurso inexplorado para o melhoramento de arroz cultivado e outros cereais considerando a distribuição natural pantropical das espécies selvagens, em biomas que variam de equatorial

a savanas, e a diversidade genética que acompanha esse espectro de ambientes (Atwell *et al.*, 2014).

Duas espécies domesticadas apresentam o genoma do tipo AA, *O. sativa* e *O. glaberrima*, e seis espécies selvagens, *O. rufipogon*, *O. barthii*, *O. nivara*, *O. longistaminata*, *O. meridionalis* e *O. glamaepatula* (Chen *et al.*, 2019). Uma vez que *O. sativa* foi domesticada a partir de um número limitado de genótipos de *O. rufipogon*, seu parente selvagem mais próximo, estima-se que apenas 10 – 20 % da diversidade genética encontrada nas espécies selvagens está presente no germoplasma de arroz cultivado (Zhu *et al.*, 2007; Palmgren *et al.*, 2015). O arroz cultivado perdeu genes que poderiam contribuir para resistência ou tolerância a estresses bióticos e abióticos durante o processo de domesticação e seleção contínua (Stein *et al.*, 2018; Hamzelou *et al.*, 2020). A espécie *O. rufipogon* pode ser encontrado em toda a Ásia e Oceania, onde a maioria dos acessos são perenes, enquanto os acessos da espécie *O. nivara* são anuais (Chen *et al.*, 2019). *O. glaberrima* é conhecida popularmente como “arroz africano”, o qual possui um baixo rendimento e é cultivada em uma área limitada na África Ocidental (Brar and Khush, 2018; Hamzelou *et al.*, 2020), sendo domesticada a partir da espécie *O. barthii* (Hamzelou *et al.*, 2020). *O. barthii* e *O. longistaminata* são espécies localizadas no continente africano, com *O. barthii* sendo principalmente distribuída na África Ocidental, enquanto *O. longistaminata* é encontrado em toda a África (Chen *et al.*, 2019) *O. meridionalis* é encontrada ao norte da Austrália, sendo a espécie mais distante do arroz domesticado no genoma AA (Moner and Henry, 2018). As espécies do genoma AA *O. meridionalis*, *O. longistaminata*, *O. glaberrima* e *O. barthii* são consideradas candidatas à tolerância ao calor e à seca com base em sua distribuição em extremos de temperatura e umidade (Menguer *et al.*, 2017).

Espécies selvagens como *O. officinalis*, *O. rhizomatis* e *O. eichingeri* possuem genoma CC. São espécies perenes e ocorrem em ambientes de florestas sombreados ou semi-sombreados, entre outros habitats. *O. punctata* possui genoma diploide BB, porém também pode existir na forma alotetraploide BBCC, o qual acredita-se que *O. eichingeri* seja a doadora do genoma CC. Ambas as populações BB e BBCC estão distribuídas na África, mas ocupando diferentes nichos. Sua forma diploide ocorre em ambientes abertos enquanto a sua forma alotetraploide em locais sombreados ou semi-sombreados. Ambas as formas apresentam potenciais para tolerância à seca, devido a sua plasticidade em extremos de umidade. As espécies perenes *O. minuta* e *O. malampuzhaensis* apresentam genoma BBCC

e parecem ter sido originadas em diferentes eventos de poliploidia se considerarmos sua distinta morfologia, distribuição e diversidade genética (Menguer *et al.*, 2017; Ray *et al.*, 2018). As espécies *O. latifolia*, *O. alta* e *O. grandiglumis* de genoma CCDD são intimamente relacionadas e possuem distribuição atual na América Latina. As espécies *O. grandiglumis* e *O. latifolia* são consideradas candidatas à tolerância a estresses por inundação por crescerem ao longo das bacias dos rios e canais (Gireesh, 2018; Atwell *et al.*, 2014). *O. australiensis* é a única representante do genoma EE, sendo endêmica do norte da Austrália (Ray *et al.*, 2018). Ela possui características que permite a sua sobrevivência em estações de seca (Henry, 2018).

As espécies *O. granulata* e *O. meyeriana* possuem genoma do tipo GG e são encontradas em ambientes de floresta sombreado (Menguer *et al.*, 2017). *O. granulata* ocupa a posição filogenética mais basal no gênero *Oryza*. Ela apresenta tolerância à ferrugem e seca, plasticidade à diferentes temperaturas e umidade, e adaptação à solos aeróbios (Barrera-Figueroa and Peña-Castro, 2018; Atwell *et al.*, 2014). No genoma FF, a única representante é *O. brachyantha*. Esta espécie é endêmica da África e possui o menor genoma do gênero *Oryza* (Menguer *et al.*, 2017). Já foi descrita apresentando resistência a estresses bióticos, como à *Cnaphalocrosis medinalis* (Guenée) (Ricachenevsky *et al.*, 2018). *O. coarctata*, conhecido como arroz selvagem asiático, pertence ao genoma KKLL. Ela cresce naturalmente em região costeira, onde as plantas experimentam a maré lunar e são expostas à submersão da água do mar, podendo suportar água salgada de até 40 dS m⁻¹ ECe (condutividade elétrica) (Chowrasia *et al.*, 2018). No genoma HHJJ, a espécie *O. longiglumis* apresenta resistência a duas doenças de arroz, como à mancha bacteriana (BB) e brusone. Ela é conhecida por crescer em regiões geográficas onde as condições climáticas variam de tropical a frio extremo, e temperado quente (Sarker *et al.*, 2018). *O. ridleyi* pertencente também ao genoma HHJJ é encontrada ao sul da Ásia. Apresenta tolerância à estresses bióticos e abióticos, tais como tolerância à broca amarela do caule e salinidade, também são adaptadas a solos aeróbios (Elshenawy and Elgamal, 2018).

1.5 *Oryza australiensis*

As espécies selvagens de arroz encontradas na Austrália sofreram isolamento gênico devido à grande distância que separa este país das demais áreas continentais. Esse isolamento

pode fornecer informações importantes sobre a genética e biologia do gênero *Oryza*, assim como ser um reservatório genético de características de interesse econômico ao combate de estresses bióticos e abióticos. As espécies *O. meridionalis*, *O. rufipogon*, *O. australiensis* e *O. officinalis* são encontradas principalmente no norte da Austrália (Fig. 1) (Henry *et al.*, 2010).

A espécie *O. australiensis*, descrita há mais de 100 anos, é uma planta geralmente perene e rizomatosa que cresce em áreas sazonalmente úmidas (Henry *et al.*, 2010). São plantas que podem apresentar variação de altura, podendo ser muito alta, com aproximadamente 3 metros, ou baixas. Apresentam panículas abertas e longas (Henry, 2019). É a única integrante do genoma EE do gênero *Oryza*, possuindo cromossomos e centrômeros mais longos quando comparados com *O. sativa* (Wu and Li, 1964). Seu genoma é estimado em 965 Mb, o maior entre os genomas diploides do gênero *Oryza*, devido à expansão decorrente de três famílias de retrotransposons como RIRE1, Kangourou and Wallabi que contribuem com cerca de 60% (605 ± 40 Mb) do tamanho do genoma (Piegu *et al.*, 2006). *O. australiensis* tem apenas o genoma de cloroplasto completamente sequenciado (135 Kb), com um total de 110 genes, 76 são codificantes de proteínas, 30 de RNA transportador (tRNA) e 4 de RNA ribossômico (rRNA) (Wu and Ge, 2016).

As sementes de *O. australiensis* são de coloração marrom avermelhada com cerca de 4,9 - 5,0 mm, menores que de outras espécies selvagens encontradas no norte da Austrália (Tikapunya *et al.*, 2017a). As propriedades de amido revelam um alto teor de amilose de cadeias curtas, uma baixa viscosidade de colagem, menor retrogradação e alta temperatura de gelatinização (Tikapunya *et al.*, 2017b). Quando comparando à sequência de genes envolvidos na biossíntese de amido para 13 espécies selvagens do gênero *Oryza*, utilizando como referência a sequência de *O. sativa*, *O. australiensis* apresenta mutações não-sinônimas para os genes *Granule Bound Amido Sintase I (GBSSI)*, *Starch Sintase IIa (SSIIa)* e *Starch Branching Enzyme IIb (SBEIIB)* (Kasem *et al.*, 2012).

Estudos utilizando as espécies selvagens endêmicas do norte da Austrália *O. australiensis* e *O. meridionalis* sob estresse por calor demonstrou que a espécie *O. australiensis* é capaz de manter as variáveis fotossintéticas e de crescimento, enquanto *O. sativa* e *O. meridionalis* apresentam inibição devido à alta temperatura. Esses resultados foram atribuídos à modificações proteicas das isoformas α e β da rubisco ativase (RCA) de *O. australiensis*. As modificações tornam as isoformas de RCA mais estáveis sob alta

temperatura. Contudo, as RCAs termotolerantes apresentam uma menor atividade catalítica, reduzindo a atividade específica em temperaturas ideais (Scafaro *et al.*, 2016). Plantas de *O. sativa* superexpressando as isoformas de RCA de *O. australiensis* e submetidas ao estresse por calor (45 °C) exibem um maior número de sementes e um maior alongamento de folha, quando comparado com plantas não transformadas. Medidas de troca gasosa mostram uma indução luminosa mais rápida na fotossíntese, mas não há diferença na assimilação de CO₂. Quando as plantas são submetidas à temperatura de 40 °C não há aumento de biomassa e número de sementes, quando comparadas com a plantas mantidas a 28 °C, indicando que o limite para danos causados pelo calor e efeitos benéficos da proteína recombinante RCA termoestável está entre 40 e 45 °C (Scafaro *et al.*, 2018).



Figura 1 – Representação das espécies selvagens de arroz na Austrália. Fonte: Atlas of Living Australia field.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Identificar e caracterizar os mecanismos envolvidos na termotolerância da espécie de arroz selvagem *O. australiensis*, e analisar a concentração de macro e micronutrientes em folhas e sementes em comparação à genótipos da espécie *O. sativa*.

2.2 Objetivos Específicos

1. Avaliar a concentração de macro e micronutrientes em folhas e sementes de acessos de *O. australiensis* em comparação com genótipos de *O. sativa*.
2. Identificar acessos com concentrações elevadas de Fe e Zn e baixas concentrações de metais pesados em folhas e sementes.
3. Identificar acessos que apresentem maior tolerância a exposição a alta temperatura de 45°C.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Análises de elemento minerais em grãos e folhas por ICP-MS

Amostras de folhas e grãos foram acondicionados e secados em estufa a 85 °C por 3 dias, e enviadas para o laboratório do Dr. David E. Salt na *University of Aberdeen*, Reino Unido, para análise do perfil ionômico. Para análises, sementes das espécies *O. australiensis* e *O. sativa* (Tabela 2) foram selecionadas e descascadas manualmente. Para folhas, sementes das espécies *O. australiensis* e *O. sativa* (Tabela 2), foram germinadas em água por 5-7 dias, e posteriormente transferidas para substrato comercial (Garden Plus®) em bandejas de cultivo com células para individualizar as plantas e orifícios para contato com a solução nutritiva. As plantas foram irrigadas com meio de cultivo, conforme descrito por Ricachenevsky et al. (2011), a cada 3-4 dias. Amostras da terceira folha completamente expandida foram coletadas quando as plantas apresentavam cinco folhas completamente expandidas.

Amostras coletadas de folhas e grãos foram mineralizadas em ácido nítrico (HNO₃) concentrado e analisadas por *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry* (ICP-MS), determinando as concentrações de Ferro (Fe), Zinco (Zn), Arsênio (As), Sódio (Na), Molibdênio (Mo), Boro (B), Magnésio (Mg), Enxofre (S), Manganês (Mn), Potássio (K), Fósforo (P), Cálcio (Ca), Cobre (Cu) e Cádmio (Cd) conforme descrito (Lahner et al. 2003; Norton et al. 2010).

Tabela 1 - Espécies do gênero *Oryza* utilizadas para avaliação do perfil ionômico em sementes e folhas.

Espécie	Cód. de identificação (IRGC)	Nome atribuído	Tecidos analisados
<i>O. australiensis</i>	86526	AUS1	Sementes e folhas
<i>O. australiensis</i>	86527	AUS2	Folhas
<i>O. australiensis</i>	86529	AUS3	Folhas
<i>O. australiensis</i>	Não possui	AUS4	Folhas
<i>O. australiensis</i>	101397	AUS6	Semente
<i>O. australiensis</i>	86528	AUS7	Sementes
<i>O. australiensis</i>	105264	AUS9	Sementes
<i>O. australiensis</i>	105269	AUS10	Sementes
<i>O. australiensis</i>	105270	AUS11	Sementes

<i>O. australiensis</i>	105272	AUS12	Sementes
<i>O. australiensis</i>	100882	AUS13	Sementes
<i>O. sativa</i>	Não possui	NIPPO	Sementes
<i>O. sativa</i>	12816	SAT1	Folhas
<i>O. sativa</i>	13475	SAT2	Sementes e Folhas
<i>O. sativa</i>	13498	SAT3	Sementes e Folhas
<i>O. sativa</i>	223336	SAT4	Sementes e Folhas
<i>O. sativa</i>	107978	SAT5	Sementes e Folhas
<i>O. sativa</i>	Não possui	SAT6	Folhas

Códigos de identificação (IRGC) são atribuídos pelo *International Rice Research Institute* (IRRI) aos acessos/genótipos conforme sua espécie. Os IRGC podem ser consultados através do endereço eletrônico <https://www.genesys-pgr.org/>.

3.2 Material vegetal e condições de crescimento

Sementes de arroz da espécie *O. sativa* L. japônica cv. Nipponbare, e de espécies selvagens de arroz como *O. australiensis* e *O. meridionalis* foram obtidas do *International Rice Research Institute* (IRRI) e multiplicadas em casa de vegetação, as quais foram submetidas a quebra de dormência durante 5 dias a temperatura de 50 °C. Em seguida, as sementes foram descascadas e esterilizadas superficialmente utilizando etanol 70% por 1 minuto, e lavadas três vezes com água destilada autoclavada. As sementes foram semeadas em placas de Petri contendo meio nutritivo Murashige e Skoog (MS) sem sacarose pH 5,8, ajustado com KOH. As placas foram mantidas a 28 °C por 3 dias com iluminação. Após a germinação, as plântulas foram transferidas para hidroponia em sistema de malha flutuante por 3 dias. Após esse período, as sementes foram transferidas para copos (400 ml) e mantidas em hidroponia com solução nutritiva (Yoshida *et al.*, 1976) pH 5,8, ajustado com NaOH. As plantas foram mantidas neste sistema, com 4 plantas por copo, até atingirem 4 folhas desenvolvidas, quando os experimentos foram iniciados. As plantas foram germinadas e cultivadas em sala de cultivo do laboratório de Genômica Funcional de Plantas do Departamento de Genética da UFRGS, a uma temperatura de 28 ± 2 °C com umidade relativa de 60-70% e fotoperíodo de 12h dia sob intensidade luminosa de $180 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e 12h no escuro. As soluções nutritivas foram renovadas completamente a cada 3 dias durante todo o período de crescimento.

3.3 Montagem da incubadora e tratamento por alta temperatura em espécies do gênero *Oryza*

Para realização dos experimentos de alta temperatura, foi construída uma incubadora cilíndrica utilizando uma estrutura metálica com 80 cm de altura e 140 cm² de diâmetro, revestida com material plástico transparente. Como fonte de calor foi utilizada uma lâmpada

de infravermelho 250W 220V E27 BR125 Philips, a qual foi posicionada no centro da estrutura a uma altura 50 cm da base. A entrada e saída de ar foi realizada através da elevação em 6 cm de ambos os lados da estrutura, a temperatura e umidade relativa do ar era registrada utilizando um termo-higrômetro digital DT-250N com sensor externo (Figura 2).

Para avaliar os efeitos do estresse térmico em plântulas de arroz, inicialmente, plântulas com até 4 folhas desenvolvidas das espécies de arroz *O. sativa* e *O. australiensis* (Tabela 1) foram submetidas a tratamento térmico de 45 °C por 4h, 8h e 12h. Após o tratamento térmico, as plantas foram mantidas a 28 °C por 7 dias para recuperação. Para o tratamento controle, foram utilizadas plantas mantidas a 28 °C. Foram realizadas mensurações de comprimento foliar e radicular após o período de recuperação. Para avaliação do efeito causado pela exposição a alta temperatura em tempo prolongado, acessos de *O. australiensis* e *O. sativa* foram selecionados. Além disso, um acesso da espécie *O. meridionalis* foi acrescentado ao experimento. Plântulas com até 4 folhas desenvolvidas foram expostas à temperatura de 45 °C por 3 dias (72 horas), sendo 12h/dia à 45 °C e 12h/escuro à 28 °C. Após o tratamento, as plantas foram retiradas da incubadora e deixadas para recuperação a 28 °C durante 7 dias. Como situação controle, as plantas foram mantidas a 28 °C por todo período de tempo. As variáveis fisiológicas foram determinadas durante o tratamento por calor e após o período de recuperação. No final do experimento, as plantas foram fotografadas e pesadas para massa fresca e seca.

Para construção da biblioteca de RNA, plantas das espécies *O. sativa* (cv. NIPPO) e *O. australiensis* (AUS1) foram submetidas ao tratamento por calor por tempo prolongado, como descrito acima. Amostras de raiz e parte aérea (PA) foram coletadas ao final do 2^a dia de tratamento e do 3^a dia de recuperação, congeladas em nitrogênio líquido e mantidas a -80 °C em ultrafreezer. Foram coletadas também amostras de parte aérea ao final do 3^a dia de tratamento por calor e o seu controle equivalente, as quais foram mantidas em estufa durante 5 dias a 60 °C para secagem e obtenção de matéria seca.

Tabela 2 – Genótipos e acessos das espécies do gênero *Oryza* utilizados para experimentos por estresse por calor.

Espécie	Cód. de identificação (IRGC)	Nome atribuído
<i>O. australiensis</i>	86526	AUS1
<i>O. australiensis</i>	86528	AUS7
<i>O. australiensis</i>	105264	AUS9
<i>O. australiensis</i>	105269	AUS10
<i>O. australiensis</i>	105270	AUS11
<i>O. australiensis</i>	105272	AUS12
<i>O. australiensis</i>	100882	AUS13
<i>O. sativa</i>	Não possui	NIPPO
<i>O. sativa</i>	223336	SAT4

Códigos de identificação (IRGC) são atribuídos pelo *International Rice Research Institute* (IRRI) aos acessos/genótipos conforme sua espécie. Os IRGC podem ser consultados através do endereço eletrônico <https://www.genesys-pgr.org/>.

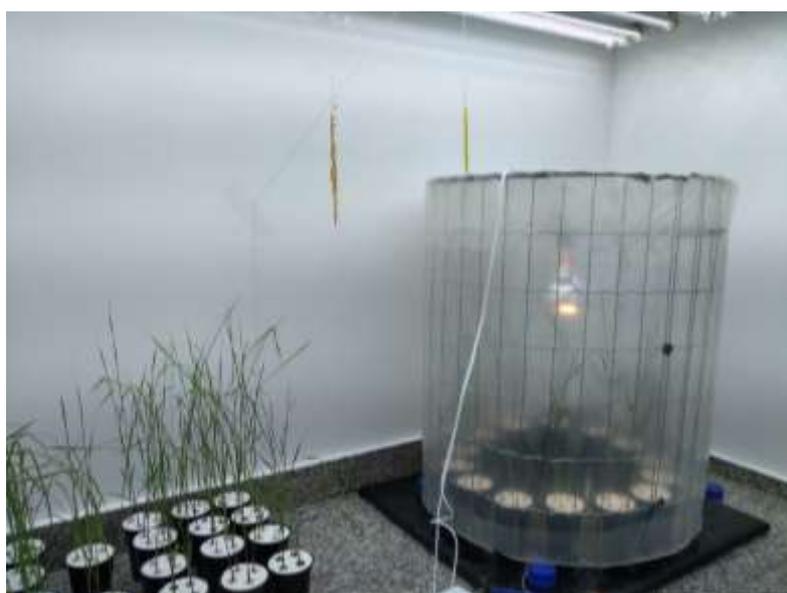


Figura 2 - Incubadora cilíndrica montada para realização do estresse por calor a 45 °C. Estrutura em funcionamento a temperatura de 45 °C utilizando como fonte de calor uma lâmpada infravermelha. Plantas posicionadas nas laterais da estrutura para evitar a exposição direta dos raios infravermelhos.

3.4 Extração de RNA e Construção das Bibliotecas para o Sequenciamento de Transcriptoma (RNA-seq)

A extração de RNA total das amostras foi realizada utilizando o método Trizol (Invitrogen®) conforme descrito pelo fabricante, e quantificadas por Nanodrop® (Thermo Fischer Scientific, Waltham, EUA). O DNA contaminante foi retirado das amostras com RQ1 DNase-free RNase® (Promega®), seguindo protocolo do fabricante. A eficiência do tratamento com DNase e a integridade do RNA foi verificado por eletroforese. Quatro replicatas biológicas foram agrupadas para gerar cada biblioteca. Um total de 24 bibliotecas serão construídas, sendo 12 bibliotecas relacionadas com amostras coletadas no 2^a dia de tratamento e seus controles e 12 bibliotecas para amostras coletadas no 3^a dia de recuperação e seus respectivos controles.

3.5 Variáveis Fisiológicas

3.5.1 Crescimento e Peso de Massa Fresca e Seca

O crescimento foi determinado pela altura da planta, sendo obtida através da medição da base da raiz até a ponta da folha bandeira. O crescimento foi expresso em centímetros e foi realizado durante o tratamento por calor e após os 7 dias de recuperação. Depois que as plantas foram medidas, foi realizada a pesagem de massa fresca. Para obtenção da massa seca, as plantas foram expostas à temperatura de 60 °C durante 6 dias, e posteriormente foi realizada a pesagem.

3.5.2 Variáveis fotossintéticas

As variáveis fotossintéticas foram avaliadas utilizando o sistema de trocas gasosas por infravermelho (IRGA) modelo LI-6400 (LI-COR Inc., Lincoln, NE, Estados Unidos). As mensurações foram realizadas com os seguintes parâmetros controlados pelo IRGA: densidade de fluxo de fótons fotossintéticos (PPFD) de 1000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, concentração de CO₂ de 400 ppm, temperatura de 40 °C, fluxo de ar de 500 $\mu\text{mol s}^{-1}$ e déficit de pressão de vapor mantido entre 2.2 e 3.5 kPa. Folhas saudáveis totalmente expandidas foram anexadas à câmara do IRGA e os valores foram registrados após estabilização dos mesmos. As

medições foram realizadas durante o tratamento por calor e ao final do período de recuperação, em horário entre 11:00 e 14:00.

3.5.3 Concentrações de Carboidratos solúveis totais e amido

As concentrações de Carboidratos solúveis totais e amido foram avaliadas pelo método colorimétrico de Dubois et al. (1956), para o qual utilizou-se a matéria seca de plantas das espécies *O. sativa* (NIPPO) e *O. australiensis* (AUS1) coletadas ao final do 3^a dia de tratamento por calor e seus respectivos controles.

3.6 Análises Estatísticas

As análises estatísticas e gráficos foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Prism Software Inc., San Diego, CA, Estados Unidos). Os valores obtidos para crescimento, peso de massa fresca e seca foram submetidos a análise de variância (ANOVA) Twoway com valor de $P < 0.05$. Os resultados obtidos da concentração de elementos minerais em grãos e folhas foram submetidos a verificação de outliers utilizando o método de intervalo interquartil e análises de variância (ANOVA) Oneway com valor $P < 0.05$ seguido por teste de Tukey. Resultados obtidos de análises de concentração de carboidratos solúveis totais e amido foram submetidos ao teste t *student* com valor $P < 0.05$.

4 RESULTADOS

4.1 Concentração de elementos em folhas e grãos

Investigamos a variação do perfil ionômico de acessos de *O. australiensis* e genótipos de *O. sativa*. Amostras de folha e semente foram submetidas à análise por ICP-MS para determinar a concentração de 14 elementos. Os resultados obtidos mostram que a variação depende tanto do elemento quanto do tecido da planta. Em folha, *O. australiensis* e *O. sativa* possuem concentrações similares dos macronutrientes potássio (K), fósforo (P), magnésio (Mg) e cálcio (Ca) (Figuras 3a, b, c, d). Para o elemento enxofre (S), o acesso AUS4 apresenta maior concentração que os genótipos de *O. sativa* (Figura 3e). Quando avaliado o perfil ionômico de grãos, ambas as espécies exibiram concentrações semelhantes para S, K e P (Figuras 4e, a, b). Os acessos AUS3, 10 e 11 possuem maior concentração de Ca (Figura 4d), e AUS3, 6, 7, 9, 10, 11, 12 e 13 de Mg (Figura 4c), quando comparado com *O. sativa*.

Entre os micronutrientes avaliados em folha, Fe, Zn, As, boro (B), manganês (Mn), cobre (Cu) e Cd apresentam concentrações semelhantes em ambas as espécies (Figuras 5a, b, c, d, e, f e g). Para o elemento sódio (Na), AUS3 exibe maior concentração de Na que os genótipos de *O. sativa* (Figura 5h). Os acessos de *O. australiensis* apresentam baixa concentração de molibdênio (Mo), o que parece ser uma característica fixa na espécie (Figura 5i). A concentração de micronutrientes em sementes dos acessos de *O. australiensis* é maior para Fe, AUS1, 7, 10 e 13 (Figura 6a); Zn, AUS1, 3, 6, 7, 10 e 11 (Figura 6b); B, todos acessos com exceção de AUS1 (Figura 6d); Na, AUS6, 7, 10, 11 e 13 (Figura 6h); Mn, AUS6, 10 e 11 (Figura 6e); Mo, AUS1 (Figura 6i); e Cd, AUS10, 11 e 13 (Figura 6g), em comparação com os genótipos de *O. sativa*. Para os elementos As e Cu não houve diferença entre as espécies (Figuras 6c, f).

Entre os acessos de *O. australiensis*, as sementes de AUS1 exibem concentrações elevadas de elementos como Fe e Zn, sendo 78% e 87% superiores quando comparados com a espécie *O. sativa*. Baixas concentrações de Cd também são evidenciadas, onde AUS1 apresenta 34% menos que em *O. sativa* e valores similares para As, dados que favorecem a escolha para estudos posteriores para biofortificação de espécies cultiváveis.

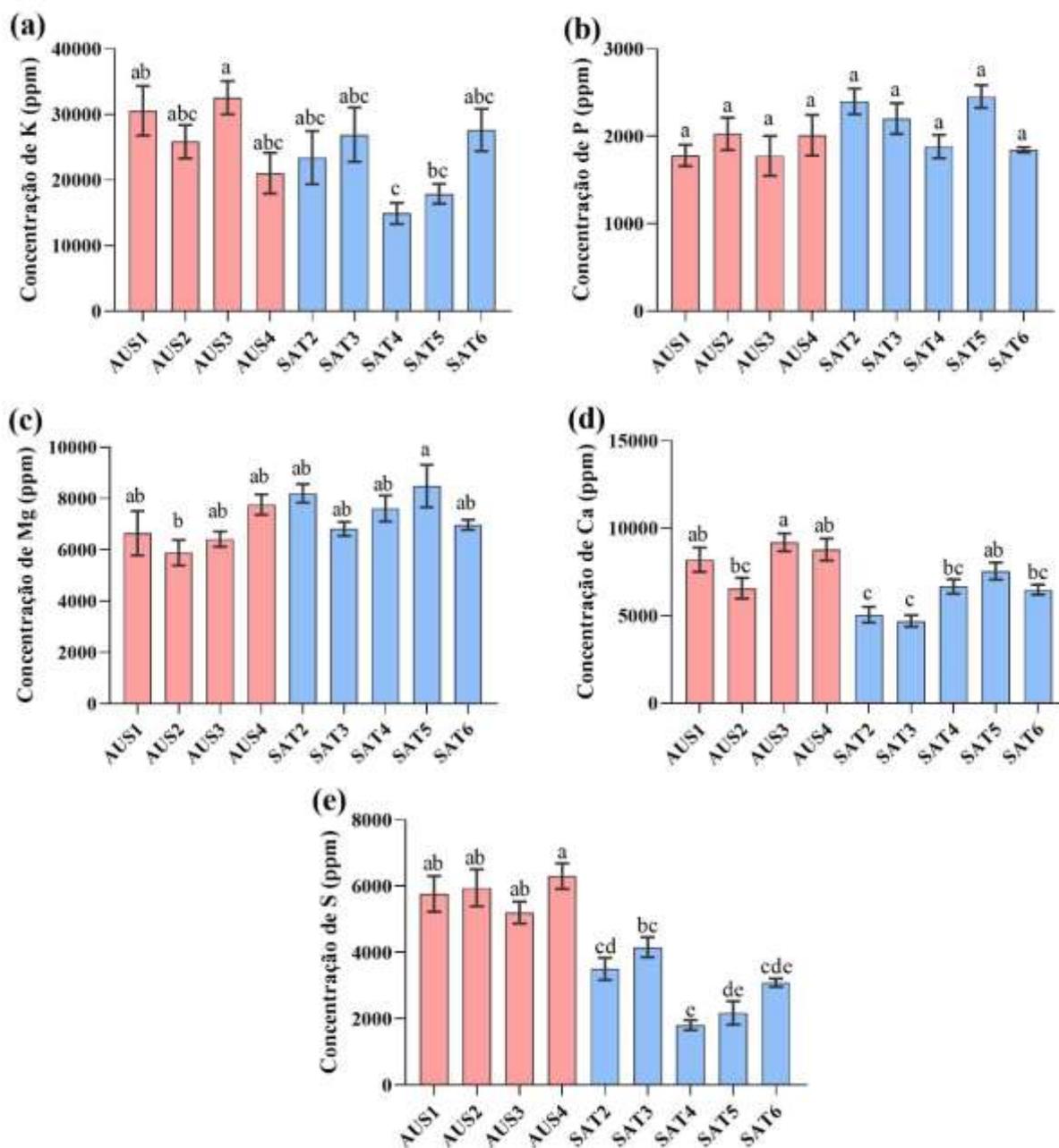


Figura 3 - Concentração de macroatmentos em folhas de acessos de *O. australiensis* e genótipos de *O. sativa*. Concentrações dos macroatmentos K (a), P (b), Mg (c), Ca (d) e S (e) são expressos em ppm. Os acessos de *O. australiensis* são representados em vermelho, enquanto acessos de *O. sativa* são representados em azul. Os dados foram conduzidos em 5 réplicas biológicas por acesso e genótipo. As comparações entre os dados foram realizadas utilizando à análise estatísticas de ANOVA Oneway com valor $P < 0.05$ seguido por teste de Tukey. Gráficos representado por barras utilizando erro padrão médio, as diferenças entre as médias dos acessos são representadas por letras, onde letras iguais não apresentam diferenças estatísticas.

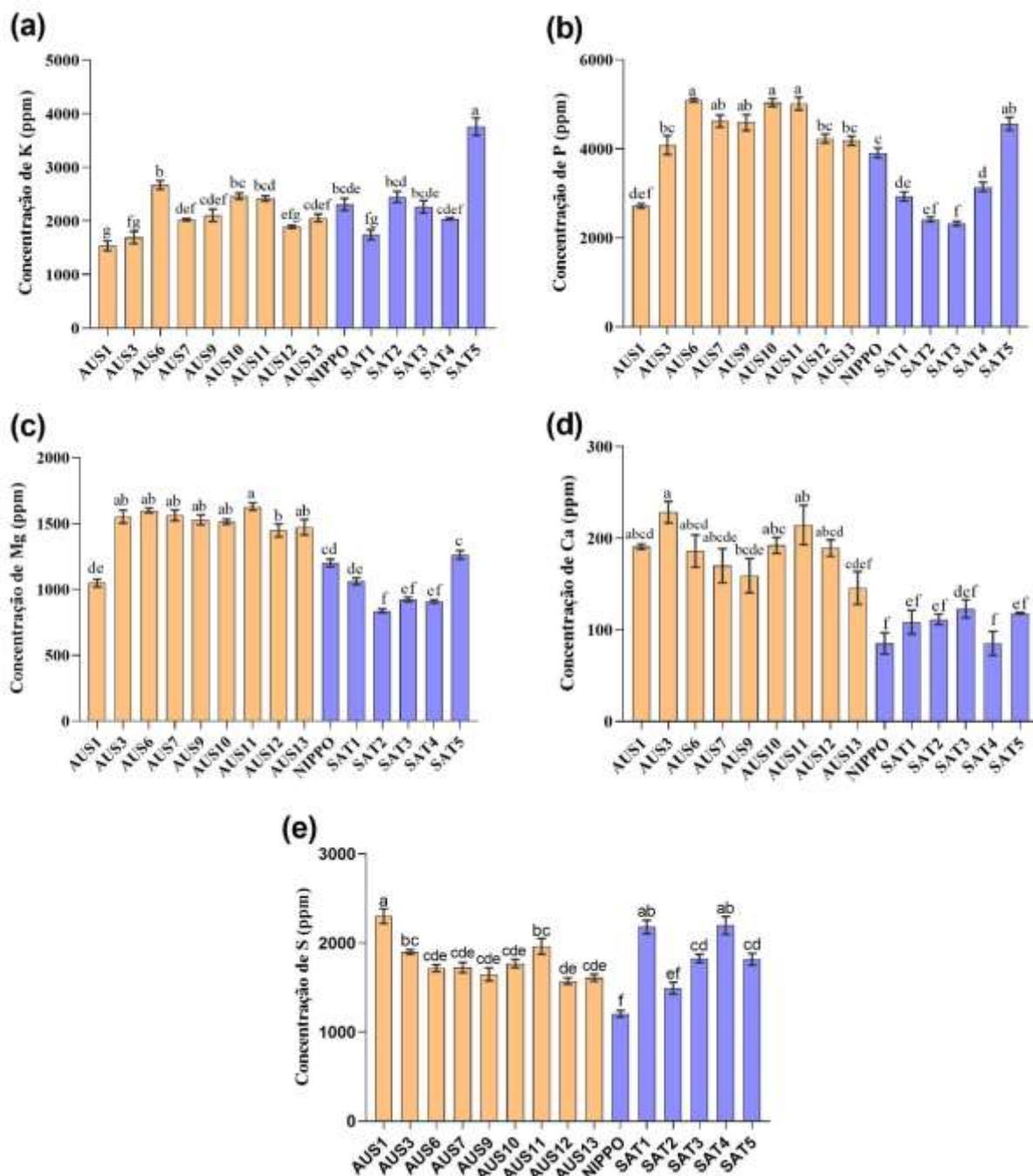


Figura 4 - Concentração de macroatmentos em sementes de acessos de *O. australiensis* e genótipos de *O. sativa*. Concentrações dos macroatmentos K (a), P (b), Mg (c), Ca (d) e S (e) são expressos em ppm. Os acessos de *O. australiensis* são representados em laranja, enquanto acessos de *O. sativa* são representados em azul. Os dados foram conduzidos em 5 réplicas biológicas o qual foram analisadas 10 sementes por acesso e genótipo. As comparações entre os dados foram realizadas utilizando a análise estatísticas de ANOVA Oneway com valor $P < 0.05$ seguido por teste de Tukey. Gráficos representado por barras utilizando erro padrão médio, as diferenças entre as médias dos acessos são representadas por letras, onde letras iguais não apresentam diferenças estatísticas.

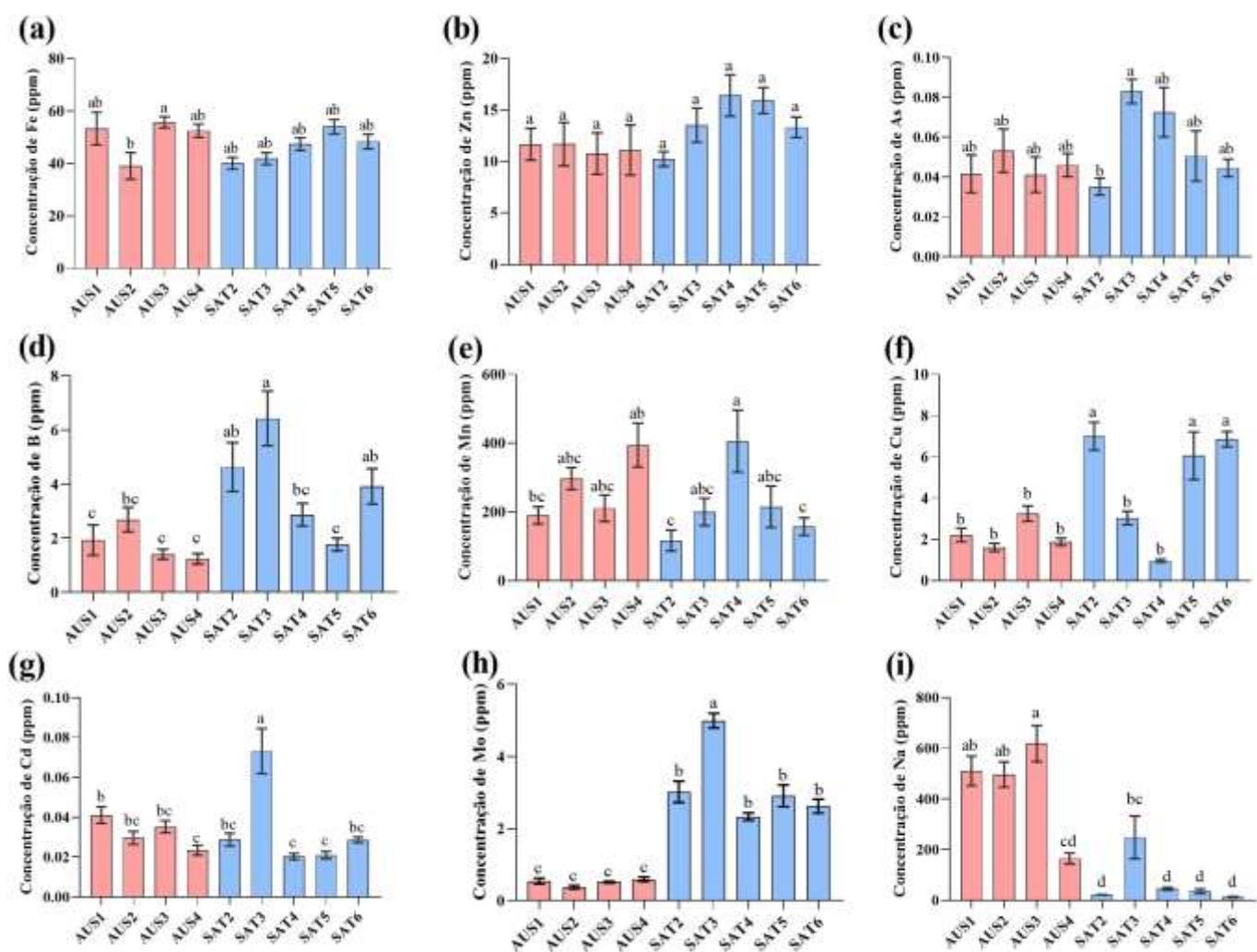


Figura 5 - Concentração de microelementos em folhas de acessos de *O. australiensis* e genótipos de *O. sativa*. Concentrações dos microelementos Fe (a), Zn (b), As (c), B (d), Mn (e), Cu (f), Cd (g), Na (h) e Mo (i) são expressos em ppm. Os acessos de *O. australiensis* são representados em laranja, enquanto acessos de *O. sativa* são representados em azul. Os dados foram conduzidos em 5 réplicas biológicas por acesso e genótipo. As comparações entre os dados foram realizadas utilizando à análise estatísticas de ANOVA Oneway com valor $P < 0.05$ seguido por teste de Tukey. Gráficos representado por barras utilizando erro padrão médio, as diferenças entre as médias dos acessos são representadas por letras, onde letras iguais não apresentam diferenças estatísticas.

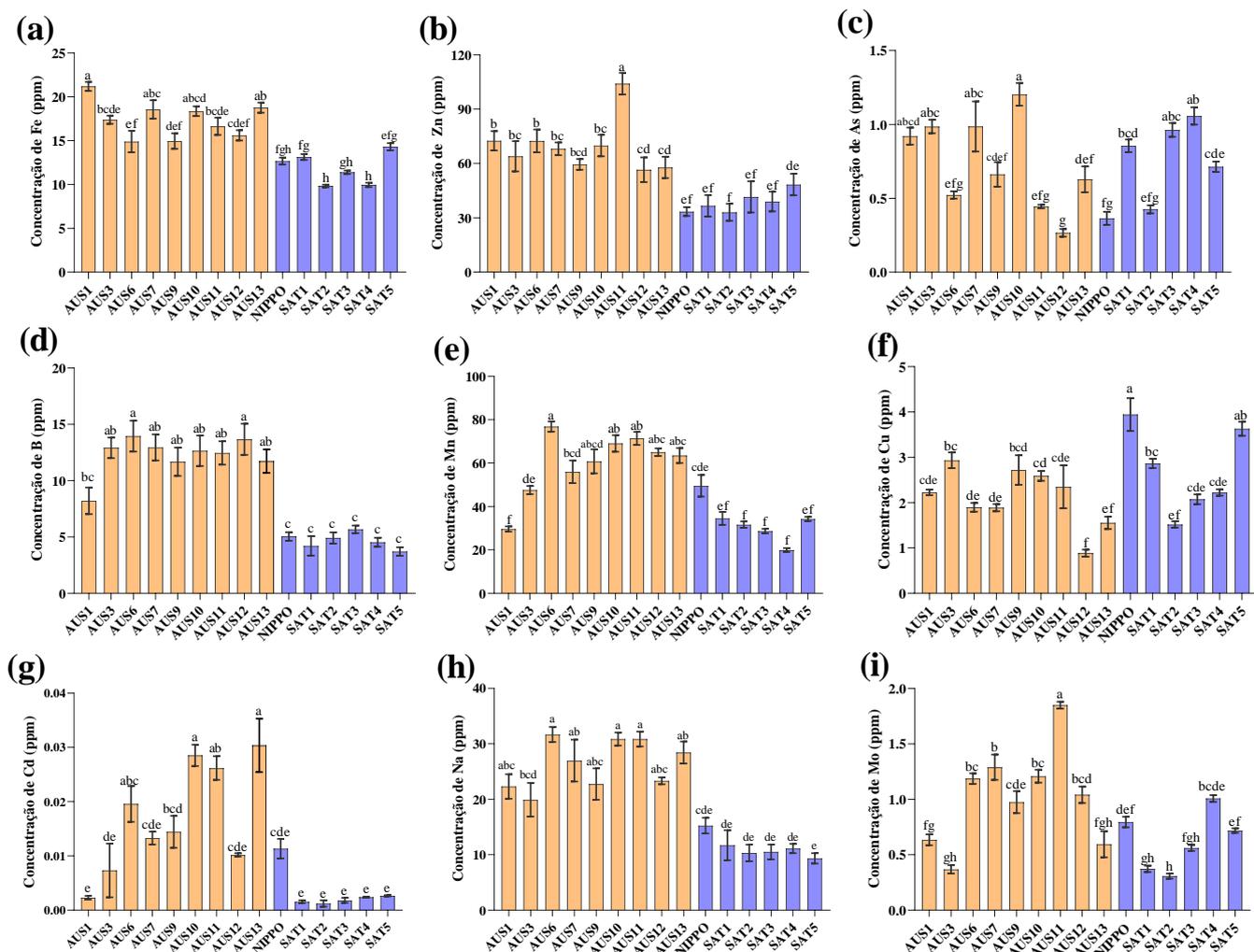


Figura 6 - Concentração de microelementos em sementes de acessos de *O. australiensis* e genótipos de *O. sativa*. Concentrações dos microelementos Fe (a), Zn (b), As (c), B (d), Mn (e), Cu (f), Cd (g), Na (h) e Mo (i) são expressos em ppm. Os acessos de *O. australiensis* são representados em laranja, enquanto acessos de *O. sativa* são representados em azul. Os dados foram conduzidos em 5 réplicas biológicas o qual foram analisadas 10 sementes por acesso e genótipo. As comparações entre os dados foram realizadas utilizando à análise estatísticas de ANOVA Oneway com valor $P < 0.05$ seguido por teste de Tukey. Gráficos representado por barras utilizando erro padrão médio, as diferenças entre as médias dos acessos são representadas por letras, onde letras iguais não apresentam diferenças estatísticas.

4.2 Experimentos de estresse por calor em espécies do gênero *Oryza*

4.2.1 Crescimento de acessos e genótipos sob estresse por calor

Inicialmente, realizamos um experimento piloto com sete acessos de *O. australiensis* e dois genótipos de *O. sativa* para verificar os acessos mais promissores sob condições de estresse por calor. As plantas no estágio de três folhas expandidas foram expostas à temperatura de 45 °C por 4, 8 e 12 horas. Após o tratamento de alta temperatura, as plantas foram mantidas na temperatura de 28 °C durante sete dias para recuperação. Após esse período, foram realizadas as medições do comprimento de parte aérea (Figura 7). Os acessos submetidos aos tratamentos por calor exibiram crescimentos diferentes quando comparados entre si. Contudo, quando comparados os tratamentos dentro de cada acesso não se obteve diferença estatística (Figura 7). Com base no número de sementes disponível para realização de novos experimentos, na maior concentração de Fe e Zn nas sementes, e na tendência, mais uniforme, de maior comprimento de parte aérea apresentada por AUS1 e AUS7, quando expostas aos tratamentos por calor, escolhemos estes dois acessos para continuar os estudos.

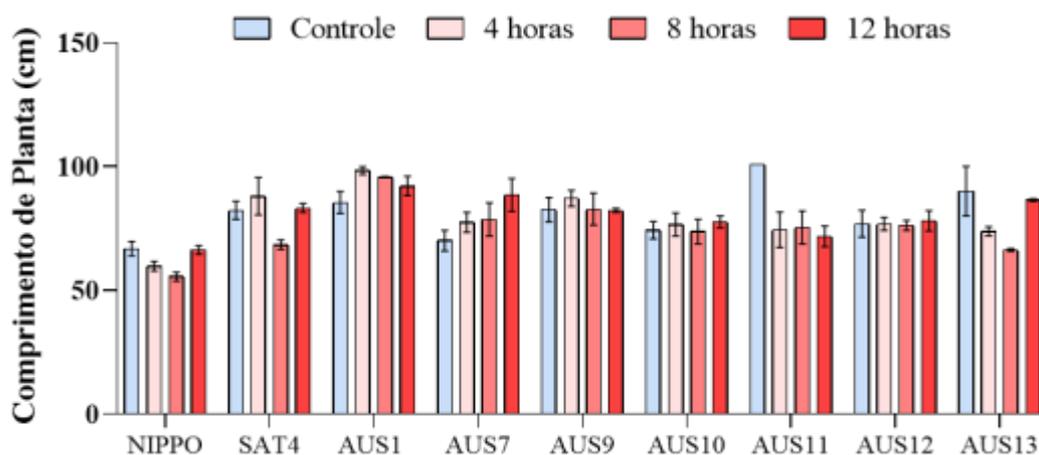


Figura 7 - Medidas de comprimento de planta de acessos de *O. australiensis* e genótipos de *O. sativa*, após os 7 dias de recuperação. Cores diferentes representam os tempos de exposição ao estresse por calor, sendo plantas mantidas em situação controle em azul e plantas submetidas ao estresse em tonalidades de vermelho. Gráfico representando em barras com erro padrão médio. Os valores são as médias e erro padrão médio de 4 réplicas biológicas. Dados submetidos ao teste de ANOVA twoway.

Posteriormente, plantas no estágio de três folhas expandidas de *O. australiensis* (AUS1 e AUS7), *O. sativa* (NIPPO) e *O. meridionalis* (MER1) foram expostas ao estresse

por calor sob fotoperíodo de 12h/dia à 45 °C e 12h/noite à 28 °C pelo período de 72 horas (3 dias). Foi acrescentado o acesso MER1 devido a relatos na literatura como sendo uma espécie termotolerante e endêmica da Austrália (Scafaro *et al.*, 2010). Após o tratamento, as plantas foram mantidas a 28 °C durante sete dias para recuperação. As coletas de dados do comprimento de parte aérea foram realizadas durante o período de estresse, ao final de cada dia, e ao final dos 7 dias de recuperação. Durante o tratamento, as plantas não apresentaram grande variações no crescimento (Figura 8b). Após os 7 dias de recuperação, foi possível visualizar que os acessos de AUS1 e AUS7 foram capazes de seguir crescendo, ao passo que MER1 e NIPPO não (Figuras 8a-c). Quando comparados com as plantas em situação controle, podemos verificar que a parte aérea dos acessos de NIPPO e MER1 apresentaram uma diminuição significativa no seu crescimento, enquanto os acessos de AUS1 e AUS7 não apresentaram diferenças significativa (Figura 8c).

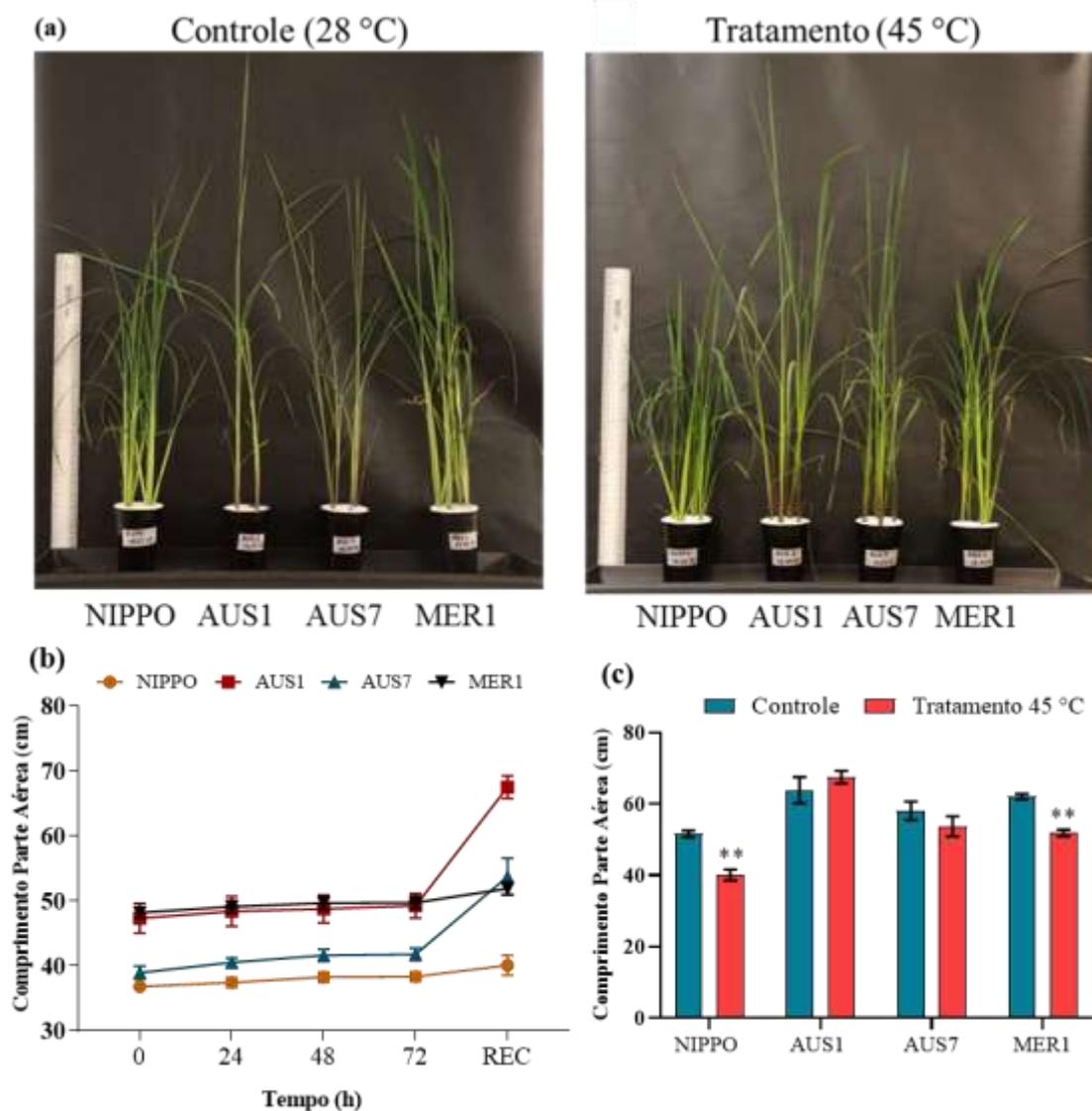


Figura 8 - Representação do experimento conduzido em alta temperatura. (a) Plantas mantidas à 28 °C e plantas submetidas ao estresse por calor de 45 °C sob fotoperíodo de 12h/dia à 45 °C e 12h/noite à 28 °C pelo período de 72 horas (3 dias) após os 7 dias de recuperação; (b) Representação do desenvolvimento das plantas durante o experimento de alta temperatura; (c) comparação entre as plantas utilizadas no experimento de alta temperatura com as plantas mantidas a 28 °C após 7 dias de recuperação. Gráficos de médias em barras utilizando erro padrão médio de 4 réplicas biológicas. Os Dados foram submetidos a análise estatística ANOVA Twoway, os asteriscos indicam significância em um valor de $P < 0,05$.

4.2.2 Parâmetros fotossintéticos

Os resultados obtidos das mensurações dos parâmetros de fotossíntese durante o experimento de estresse por alta temperatura (Figura 9) permitiram observar que nas primeiras 12h de estresse, os acessos de NIPPO e MER1 apresentaram variações em sua taxa de assimilação de CO₂, enquanto o acesso de AUS1 se manteve constante e AUS7 apresentou aumento. Conforme o decorrer do experimento, AUS7 apresentou um aumento constante da sua taxa de assimilação de CO₂, AUS1 permaneceu constante enquanto NIPPO e MER1 apresentaram diminuições e aumento durante o estresse (Figura 9a). Quanto à condutância estomática, AUS7 apresentou um aumento constante e AUS1 obteve um aumento após 12h e após permaneceu constante até o final do estresse. Similarmente, NIPPO e MER1 obtiveram uma variação em resposta ao estresse, ocorrendo um aumento na resposta e posteriormente um declínio para NIPPO, e uma redução e aumento para MER1 até o final do tratamento (Figura 9b). A transpiração manteve-se constante para NIPPO e MER1, os quais exibiram um aumento progressivo até o período de 48 horas, onde posteriormente, MER1 apresentou um declínio e NIPPO manteve-se constante. AUS1 apresentou um aumento até 24 horas e após manteve-se constante, enquanto AUS7 apresentou um aumento constante (Figura 9c). A concentração interna de CO₂ foi semelhante entre os acessos e genótipos, com exceção de AUS7 que não apresentou um aumento inicial semelhante aos demais (Figura 9d). Ao avaliar a eficiência do uso de água, AUS7 permaneceu constante enquanto AUS1, NIPPO e MER1 apresentaram declínios e aumentos ao longo do tratamento. AUS1 apresentou uma redução durante 24 horas de estresse e após sua resposta permaneceu constante (Figura 9e). Quando verificados os parâmetros fotossintéticos após os 7 dias de recuperação, não foi observada diferenças significativas entre os acessos e genótipos submetidos ao estresse por calor com os acessos e genótipos mantidos em situação controle (Figura 10).

Adicionalmente, foram realizados ensaios para verificar a resposta dos parâmetros fotossintéticos sob uma temperatura de 40 °C durante 1 hora, utilizando folhas de plantas crescidas durante 25 dias e mantidas à temperatura de 28 °C (Figura 11). Devido ao tempo que o equipamento necessita para chegar a temperatura desejada e parâmetros ajustados, foram utilizados os dados correspondentes a 10 minutos posteriores ao início do estresse. Como resultados, os acessos e genótipos apresentaram pouca variação em sua resposta de

assimilação de CO₂ (Figura 11a). Para transpiração, os acessos e genótipos apresentam um aumento quando submetidos ao estresse por calor (Figura 11b). Quando avaliada a condutância estomática, AUS7 apresenta um aumento seguido de uma redução, mantendo-se similar a MER1. AUS1 e NIPPO apresentaram respostas semelhantes em sua condutância sob estresse por calor (Figura 11c). A temperatura foliar, quando avaliada após a exposição a temperatura alta, foi semelhante entre os acessos e genótipos, com exceção de MER1 cuja temperatura foliar foi menor (Figura 11d). O parâmetro de uso eficiente de água foi semelhante entre os acessos e genótipos, porém menor quando avaliado em AUS7 em relação aos demais (Figura 11e).

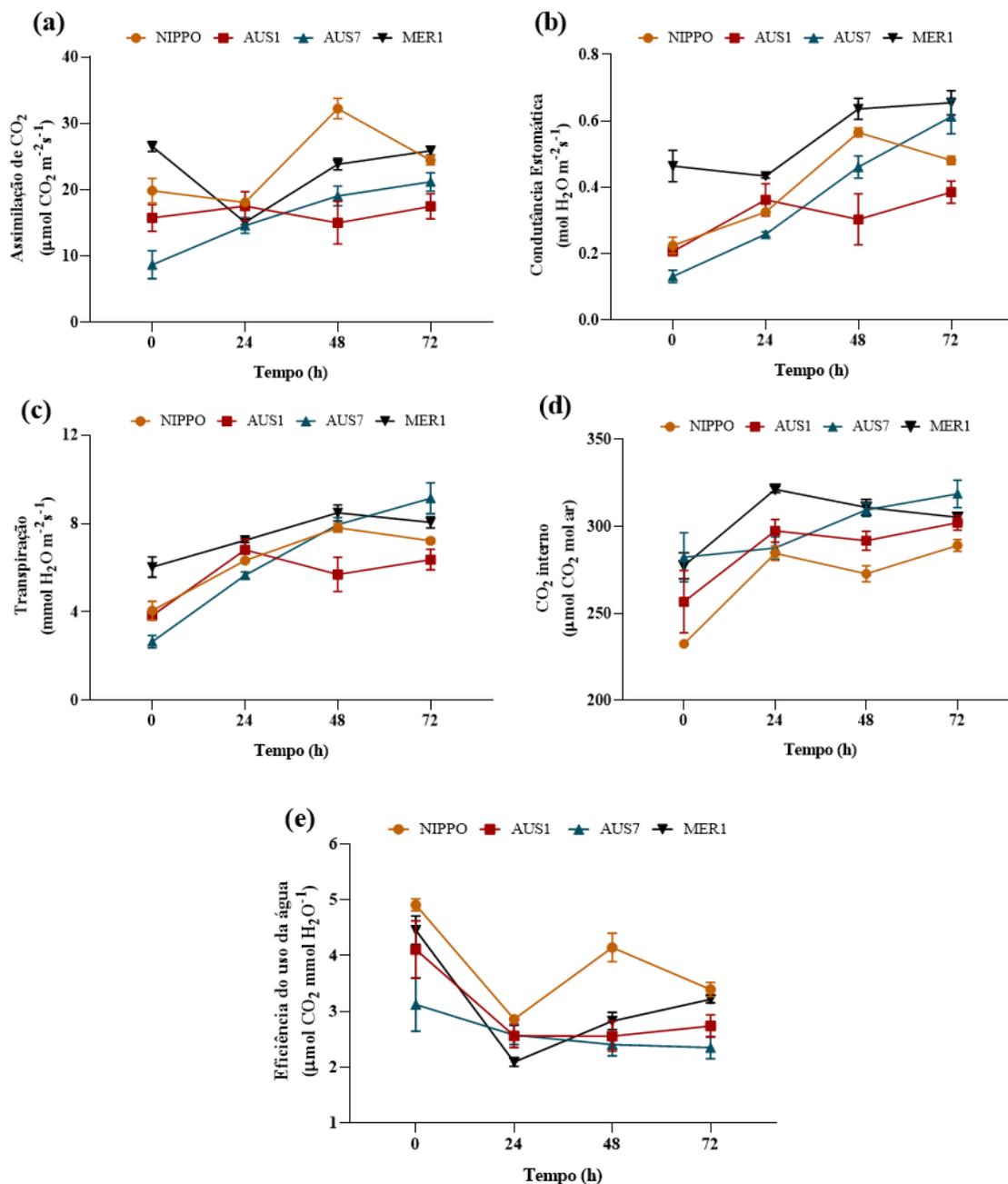


Figura 9 - Parâmetros fotossintéticos avaliados durante o experimento de estresse por calor (45°C) por 72 horas (3 dias). (a) Assimilação de CO₂; (b) condutância estomática; (c) Transpiração; (d) Concentração interna de CO₂; (e) eficiência do uso de água; (h). Foi avaliado o genótipo de *O. sativa* (NIPPO) e os acessos de *O. meridionalis* (MER1) e dois de *O. australiensis* (AUS1 e AUS7) durante o estresse por calor (45 °C), com umidade relativa de 25-35%, intensidade luminosa de 180 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ e fotoper\u00edodo 12/d\u00eda a 45 °C e 12h/noite a 28 °C. Gr\u00e1ficos em linhas exibindo erro padr\u00e3o m\u00e9dio.

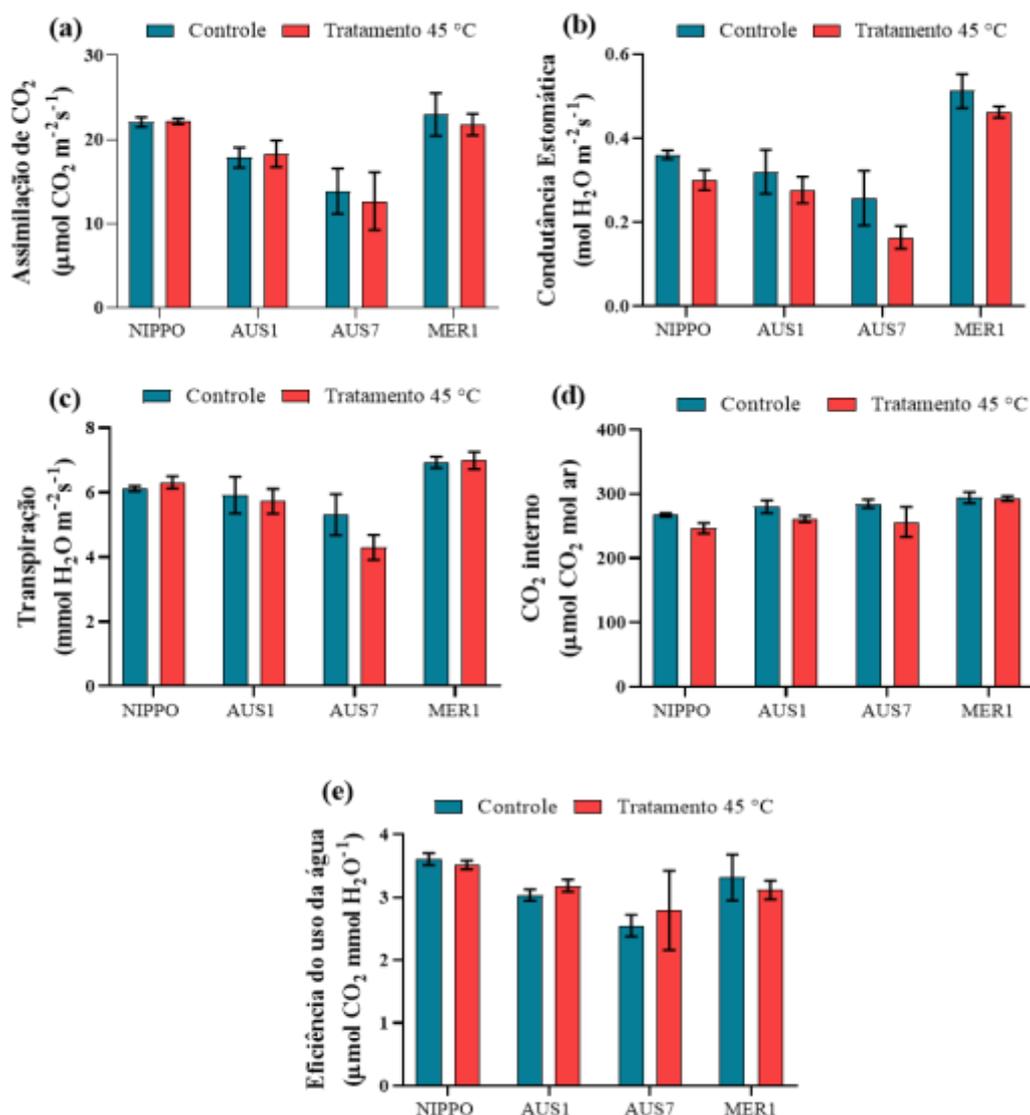


Figura 10 - Parâmetros fotossintéticos avaliados após a recuperação de 7 dias. Foram utilizados para comparações os acessos e genótipos mantidos em condição controle com os que foram submetidos ao estresse por calor de 45 °C após os 7 dias de recuperação a temperatura de 28 °C. (a) Assimilação de CO₂; (b) Condutância estomática; (c) Concentração de CO₂ intracelular; (d) Transpiração; (e) Eficiência do uso de água; (h). O genótipo de *O. sativa* (NIPPO) e acesso de *O. meridionalis* (MER1) e dois de *O. australiensis* (AUS1 e AUS7) foram submetidos ao estresse por calor (45 °C) e após 7 dias de recuperação foram comparados com plantas mantidas a 28 °C, umidade relativa de 60-80%, intensidade luminosa de 180 μmol fótons m⁻² s⁻¹ e fotoperíodo 12/12h dia/noite à 28 °C. Gráficos de médias em barras utilizando erro padrão médio de 4 réplicas biológicas. Dados foram submetidos a análise estatística ANOVA Twoway, os asteriscos indicam significância em um valor de P<0,05.

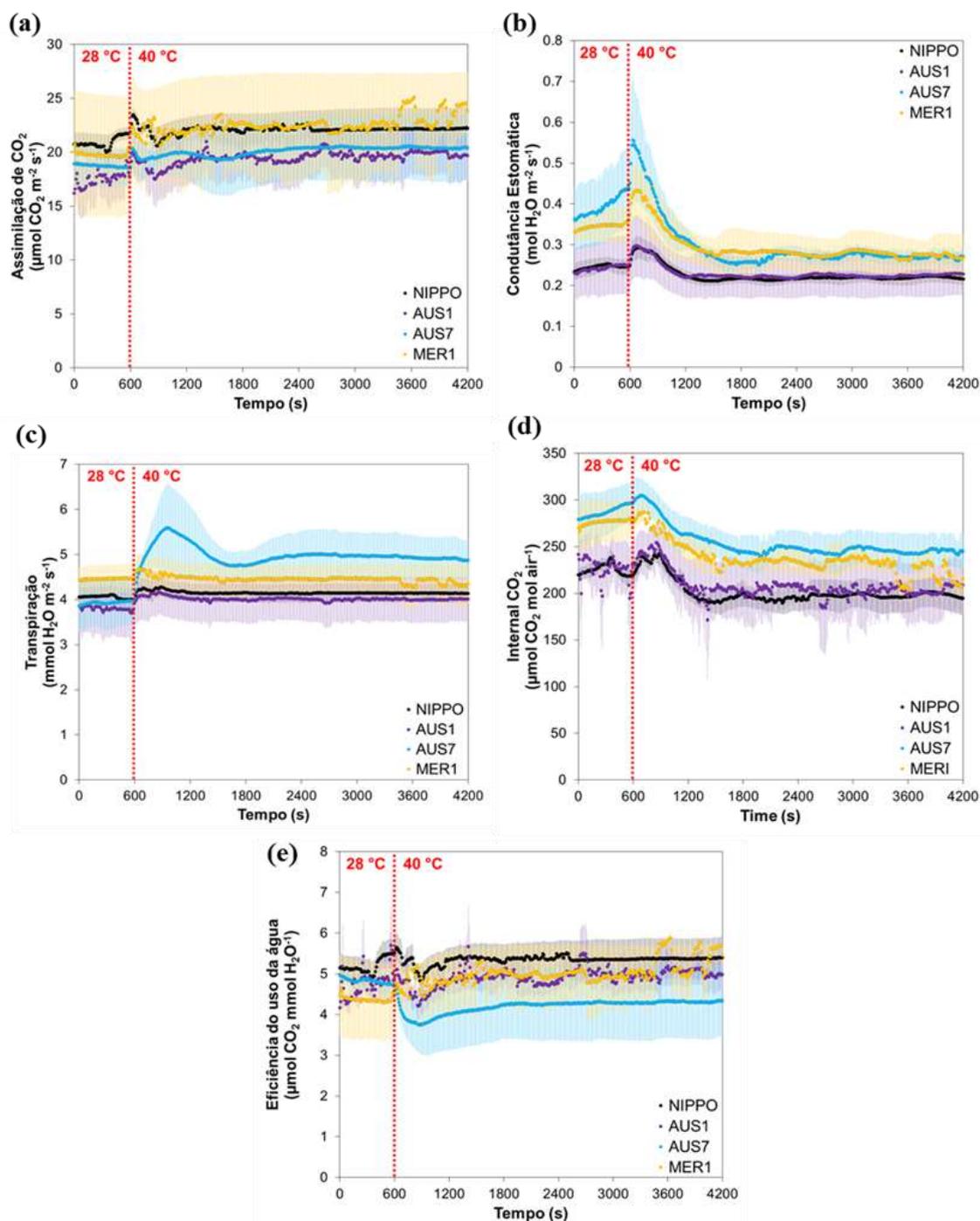


Figura 11 - Parâmetros fotossintéticos obtidos durante 1h a temperatura de 40 °C. Foram utilizados acessos e genótipos crescidos e mantidos sob temperatura de 28 °C. (a) Assimilação de CO₂; (b) condutância estomática; (c) eficiência do uso de água; (d) temperatura foliar; (e) transpiração. Foram utilizadas folhas de acessos de *O. meridionalis* (MER1) e de *O. australiensis* (AUS1 e AUS7) e genótipos de *O. sativa* (NIPPO). Divisão em linhas pontilhadas vermelhas representam o período de 10 min (600s) para estabilização e normalização dos parâmetros do equipamento. Dados foram mensurados a cada 10 segundos, folhas foram expostas a intensidade luminosa de 1000 μmol fótons m⁻².s⁻¹.

4.2.3 Extração de RNA e Construção das Bibliotecas para RNAseq

Com base nos resultados e parâmetros analisados, selecionamos o acesso AUS1 de *O. australiensis* e o genótipo NIPPO de *O. sativa* para estudos de transcriptômica. Onde o experimento foi realizado durante 3 dias (72 horas) com fotoperíodo de 12h/dia à 45 °C e 12h/noite à 28 °C. Folhas de AUS1 e NIPPO foram coletadas ao final do segundo dia de estresse por calor e ao final do terceiro dia de recuperação, como controle foram coletadas folhas de AUS1 e NIPPO crescidas e mantidas em situação controle. Resultando em 12 bibliotecas para AUS1 em situação controle e tratamento, e 12 bibliotecas para NIPPO em situação controle e tratamento, resultando assim em 24 bibliotecas. As amostras foram utilizadas para extração de RNA (Figura 12) e encaminhadas para sequenciamento (em processamento).

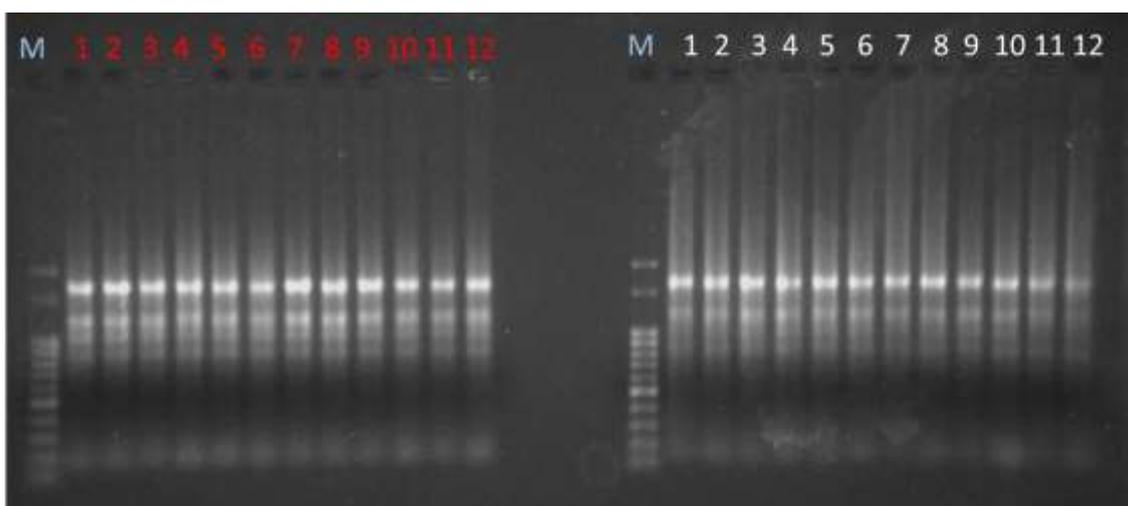


Figura 12 - Eletroforese das amostras de RNA de plantas coletadas ao final do segundo dia de tratamento a 45 °C e ao terceiro dia de recuperação a 28 °C. Em vermelho, plantas coletadas ao final do segundo dia de tratamento, colunas 1-6 representam controle e tratamento para *O. australiensis*, 7 a 12 controle e tratamento para *O. sativa*. Em branco, plantas coletadas ao final do terceiro dia de recuperação, colunas 1-6 representam controle e tratamento para *O. australiensis*, 7 a 12 controle e tratamento para *O. sativa*. M (azul), representa marcador de 100pb.

4.2.4 Concentrações de amido e carboidratos solúveis totais e peso de massa fresca e seca

Ao final do experimento por estresse por calor, o qual foi realizado para coleta de material para análises de transcriptoma, foram realizadas mensurações do peso de massa fresca (PMF) e peso de massa seca (PMS) utilizando plantas mantidas 7 dias após o período de recuperação. Os resultados obtidos mostraram que AUS1 acumula mais massa, ou seja, cresce mais, quando submetido ao estresse por calor quando comparado ao seu controle (Figuras 13a-b). Para análises de carboidratos solúveis totais, não houve diferença na concentração entre plantas de AUS1 e NIPPO submetidos a estresse por calor com aqueles mantidos como controle (Figura 14a). Para amido, houve uma redução para AUS1 e NIPPO expostos ao estresse em comparação com plantas mantidas em situação controle, sendo essa redução mais evidenciada em NIPPO (Figura 14b).

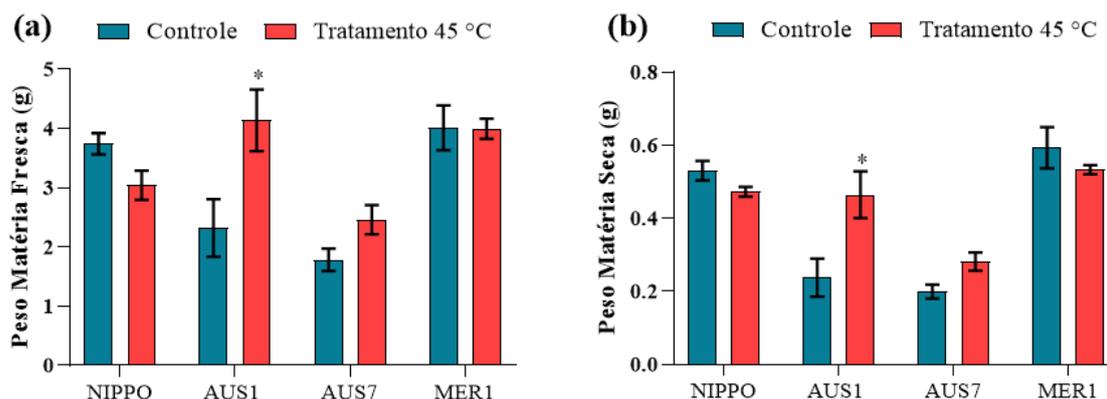


Figura 13 - Comparação entre os pesos de matéria fresca e seca de plantas expostas ao estresse por calor após a recuperação de 7 dias à 28 °C. Plantas mantidas em situação controle foram comparadas com plantas expostas ao estresse por calor sob fotoperíodo de 12h/dia a 45 °C e 12h/noite a 28 °C pelo período de 72 horas (3 dias) e mantidas 7 dias de recuperação. (a) Matéria fresca; (b) Matéria seca. Gráficos em barras representados por erro padrão médio. Gráficos de médias em barras utilizando erro padrão médio de 4 réplicas biológicas. Dados foram submetidos a análise estatística ANOVA Twoway, os asteriscos indicam significância em um valor de $P < 0,05$.

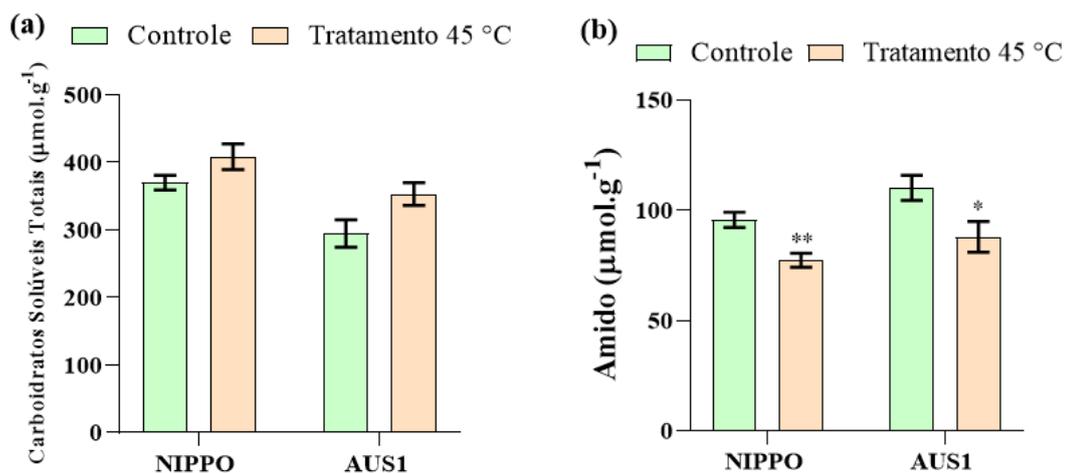


Figura 14 - Concentração de carboidratos solúveis totais e amido em folhas dos acessos coletados ao final do terceiro dia (72h) de tratamento por calor. Concentrações mensuradas utilizando matéria seca de plantas submetidos ao estresse por calor e mantidas em condição controle. (a) Concentração de carboidratos solúveis totais de plantas mantidas a temperatura de 28 °C comparadas com plantas tratadas sob alta temperatura de 45 °C; (b) Concentração de amido em plantas mantidas a temperatura de 28°C comparadas com plantas tratadas sob alta temperatura de 45 °C. Gráficos de médias em barras utilizando erro padrão médio. Dados submetidos análises por teste t, os asteriscos representam significância entre os tratamentos a um valor $P < 0.05$ (*) e $P < 0.01$ (**).

5 DISCUSSÃO

O ionoma é definido como o nutriente mineral e a composição dos traços de elementos em um organismo, representando o componente inorgânico dos sistemas celulares e orgânicos (Salt *et al.*, 2008). Este conceito foi proposto há mais de 10 anos (Lahner *et al.*, 2003), desde então progressos foram feitos no campo da ionômica em que o perfil de elementos é combinado com a genética visando a identificação de genes responsáveis pelo controle do ionoma (Huang and Salt, 2016).

Neste trabalho, folhas de acessos de *O. australiensis* e de genótipos de *O. sativa* apresentaram concentrações similares para macronutrientes como K, P, Mg e Ca (Figuras 3a, b, c e d). Estes resultados sugerem que ambas as espécies compartilham mecanismos de captação e translocação semelhantes para esses elementos. Normalmente, os macronutrientes são absorvidos pelas raízes das plantas da solução do solo na forma iônica, como os metais Ca^{2+} , Mg^{2+} e K^+ presentes como cátions livres, P e S como seus oxianions fosfato (PO_4^{3-}) e sulfato (SO_4^{2-}), e N como nitrato aniônico (NO_3^-) ou cátion amônio (NH_4^+) (Maathuis 2009). As raízes de arroz possuem duas faixas de Caspary, na exoderme e endoderme. Elas funcionam como uma barreira para o fluxo apoplástico de água e elementos entre as camadas celulares (Enstone *et al.*, 2002; Sasaki *et al.*, 2016). A eficiência de translocação de nutrientes da raiz para parte aérea é determinada pela mobilidade no floema e transporte no xilema. Elementos como Mg, P e K geralmente apresentam alta mobilidade no floema, enquanto Ca é dependente da transferência pelo xilema (Du *et al.*, 2020).

Em relação ao elemento S, foi observado que folhas do acesso AUS4 apresentam maiores concentrações quando comparados com os genótipos de *O. sativa* (Figura 2e). Em plantas, o S é absorvido na forma de sulfato (SO_4^{2-}) por membros da família de transportadores SULTR. Existem ao menos 12 membros dessa família em *Arabidopsis* (Takahashi *et al.*, 2012a), os quais SULTR1;1 e SULTR1;2 são expressos na epiderme e córtex radicular e envolvidos diretamente na absorção do SO_4^{2-} (Shibagaki *et al.*, 2002). Um estudo realizado com diferentes acessos de *Arabidopsis thaliana* identificou duas variantes da enzima Adenosina 5'-fosfosulfato redutase 2 (APR2) com uma forte diminuição da capacidade catalítica. APR2 é uma enzima-chave na redução de sulfato, e sua atividade reduzida leva a uma diminuição do fluxo de enxofre do sulfato para os compostos de enxofre reduzidos, cisteína e glutatona, e para as proteínas, concomitante com um aumento no

acúmulo de sulfato nas folhas (Chao *et al.*, 2014). Contudo, o mecanismo de captação e distribuição de S em *O. sativa* e *O. australiensis* ainda não foram elucidados.

Avaliando os micronutrientes em folha, foi encontrado maiores níveis de Na em AUS3 quando comparado com os genótipos de *O. sativa* (Figura 5h). O sódio constitui o sexto elemento mais abundante na terra, e os sais de sódio dominam muitos solos salinos do mundo (Wu, 2018). Para as plantas, o íon sódio (Na^+) pode ser prejudicial, enquanto o íon potássio (K^+) é essencial para reduzir a absorção de Na^+ (Wang and Huang, 2017). Muitos transportadores como os membros das famílias HAK/KUP/KT, HKT e LCT, desempenham papéis importantes na captação e translocação de K e Na em plantas (Wu *et al.*, 2009; Munns and Tester, 2008). Transportadores e canais de íons no tonoplasto desempenham um papel crucial na tolerância à salinidade nas plantas. Esse processo ocorre pelo sequestro de íons em excesso no citoplasma para os vacúolos (Ganie *et al.*, 2019). Para o elemento Mo, os acessos apresentaram baixas concentrações quando comparados com genótipos de *O. sativa* (Figura 5i). Estudos realizados utilizando populações naturais de *Arabidopsis* identificaram uma deleção na região promotora de um gene transportador de Mo (*MOT1*) localizado em mitocôndrias. Essa deleção causava uma redução nos níveis de expressão do gene *MOT1* fazendo com que a planta acumulasse menos Mo em folhas (Baxter *et al.*, 2008). Entretanto, na espécie *O. australiensis* ainda não foi relatado possíveis genes ou vias metabólicas envolvidas no transporte ou acúmulo de Mo em folhas ou raiz.

Em sementes, a distribuição de elementos minerais é mediada por transportadores localizados nos nós em gramíneas. Em arroz os nós apresentam sistemas vasculares formados principalmente por feixes vasculares aumentados (FVA) e difusos (FVD). A transferência intervacular de elementos minerais dos feixes FVA para os FVD é necessário para distribuição dos elementos para os demais tecidos em desenvolvimento e panículas (Huang *et al.*, 2020b). Quando avaliado o conteúdo de macronutrientes em sementes, observamos que a concentração de S, K e P apresentaram semelhanças entre as espécies (Figuras 4e, a, b). Contudo quando verificado Ca, os acessos AUS3, 10 e 11 apresentaram concentrações superiores aos genótipos de *O. sativa* (Figura 4d). O cálcio é um nutriente mineral essencial que atua como mensageiro secundário fundamental nas células vegetais (White and Broadley, 2003). Em relação ao Mg, grande parte dos acessos de *O. australiensis* apresentaram valores superiores aos genótipos de *O. sativa* (Figura 4c), o que sugere ser uma característica da espécie. Mg é um macronutriente essencial para o crescimento das plantas,

que funciona não apenas como um dos constituintes da clorofila, mas também como ativador de muitas enzimas (Chen and Ma, 2013). Contudo, ainda não foram identificados transportadores envolvidos nos processos de transporte e distribuição de Ca e Mg em nós de arroz.

Quando avaliados os micronutrientes em sementes, observamos concentrações superiores para os elementos Fe, Zn, B, Na, Mn, Mo e Cd em alguns acessos de *O. australiensis* quando comparados com os genótipos de *O. sativa* (Figuras 6a, b, d, h, e, i, g). Interessantemente, o acesso AUS1 apresenta apenas aumento nas concentrações de Fe e Zn (Figuras 6a, b). O Fe é um micronutriente essencial para o crescimento e desenvolvimento da planta. Em plantas, a capacidade de alterar o estado redox de Fe^{2+} para Fe^{3+} permite que o elemento atue em reações de transferência de elétrons tanto na fotossíntese, como na respiração. Além de atuar como cofator de enzimas envolvidas na fixação de nitrogênio, biossíntese de clorofila e síntese de DNA (Yokosho *et al.*, 2016). Em arroz, as raízes absorvem Fe na forma de Fe^{2+} e Fe^{3+} , as quais dependem das condições de crescimento da planta. Em condições de alagamento, ele é disponível na forma reduzida Fe^{2+} em altas concentrações, sendo captado através de OsIRT1 e OsIRT2 (Wang *et al.*, 2020). Em solo, o Fe é encontrado na forma Fe^{3+} . Para captar Fe^{3+} as raízes secretam ácido 2-desoximuginéico (DMA) com a função de quelação, e o complexo é absorvido através do transportador OsYSL15 (Wairich *et al.*, 2019; Huang *et al.*, 2020). Em seguida, uma parte do Fe é sequestrada para os vacúolos através dos transportadores OsVIT1 e OsVIT2 (Zhang *et al.*, 2012), enquanto a outra porção é transportada pelo xilema por transportadores ainda não identificados, mas semelhantes a OsFRDL1, o qual é um transportador de efluxo de citrato necessário na translocação eficiente de Fe da raiz para a parte aérea. Transportadores envolvidos na transferência intervascular de Fe ainda não foram identificados, mas OsFRDL1 está envolvido na distribuição de Fe para as panículas pela liberação de citrato para solubilização de Fe depositado no apoplasto das células de parênquima do nó (Yokosho *et al.*, 2016). Adicionalmente, dois membros YSL (*OsYSL2* e *OsYSL9*) estão envolvidos no carregamento e distribuição de Fe ao longo do desenvolvimento de grãos (Senoura *et al.*, 2017). Foi demonstrado em estudos realizados por Wairich *et al.* (2019) que raízes da espécie *O. australiensis* quando em situação de privação de Fe, induzem genes relacionados à captação e transporte de Fe YSL15, IRO2 e NRAMP1. Contudo não foi evidenciada a expressão de *OsIRT1* tanto em situação controle quanto em deficiência de Fe, o que sugere

que a espécie não utiliza deste meio para captação. Sendo assim, estudos mais aprofundados serão necessários para elucidar melhor os mecanismos envolvidos na captação e homeostase de Fe em *O. australiensis*.

O zinco (Zn) desempenha um papel fundamental nas plantas como cofator enzimático e componente estrutural de proteínas (Sasaki *et al.*, 2016). Sua captação é mediada por OsZIP9 e OsZIP1. OsZIP9 encontra-se na exoderme e endoderme das raízes de arroz, o qual é responsável pela captação inicial no solo (Huang *et al.*, 2020a), enquanto OsZIP1 é expresso na epiderme e tecidos vasculares de raízes e folhas (Sasaki *et al.*, 2015). O sequestro para os vacúolos radiculares é mediado por OsHMA3 (Cai *et al.*, 2019), enquanto sua translocação da raiz para parte aérea é mediada por OsHMA2 (Takahashi *et al.*, 2012b). A distribuição nos grãos é realizada por OsZIP3 e OsHMA2, localizados nos nós. OsZIP3 é localizado nas células de transferência do xilema em FVA (Sasaki *et al.*, 2015), enquanto OsHMA2 é localizado na região do floema de FVA e FVD (Yamaji *et al.*, 2013). OsZIP4 também localizado nos nós, está envolvido com o transporte de Zn para o floema de FVD para subsequente distribuição aos tecidos em desenvolvimento (Mu *et al.* 2020). Adicionalmente, *O. australiensis* não teve os mecanismos de captação e distribuição de Zn caracterizados. Contudo, foi evidenciado que a espécie *O. meridionalis*, também endêmica da Austrália, apresenta concentrações superiores de Zn nos grãos quando comparada com *O. sativa* (Ishikawa *et al.*, 2017).

Foi observado que AUS1 apresenta baixas concentrações de Cd em seus grãos quando comparada com os demais acessos de *O. australiensis*. Essa baixa concentração foi similar a concentração evidenciada em genótipos de *O. sativa*, com exceção do genótipo NIPPO que apresentou valores maiores. O Cd é um dos metais pesados mais tóxicos e causa sérios problemas à saúde humana (Uraguchi *et al.*, 2011). A meia vida de Cd no corpo é estimada em aproximadamente 30 anos, o que leva à toxicidade crônica. O acúmulo de Cd nos grãos de arroz se tornou uma ameaça crescente para agricultura, principalmente na Ásia onde o arroz é uma das principais fontes de alimentos para a população (Takahashi *et al.*, 2011). A captação de Cd é mediada por OsNramp1 e OsNramp5, que se encontram na exoderme e endoderme radicular de arroz, sendo responsáveis pela captação e absorção do solo (Takahashi *et al.*, 2011; Sasaki *et al.*, 2012). O sequestro para o vacúolo é mediado por OsHMA3, enquanto sua translocação para o xilema é mediada por OsHMA2 (Takahashi *et al.*, 2012b). Na exoderme da raiz e em células do parênquima do xilema, a expressão de

CAL1 auxilia no transporte de Cd através dos vasos do xilema (Lou *et al.*, 2018). A distribuição para os grãos, é mediada pelo OsLCT1 localizado nos nós (Uraguchi *et al.*, 2011). Para a espécie *O. australiensis*, não foi relatado até o momento os mecanismos ou genes envolvidos no transporte e captação de Cd.

O estresse por calor é usualmente definido como a elevação da temperatura em níveis acima do ótimo, e com duração suficiente para causar danos irreversíveis ao crescimento e desenvolvimento da planta (Hall and Hall, 2018). Em estudos iniciais, identificamos que quando submetidos ao estresse por calor, tanto os acessos de *O. australiensis* quanto os genótipos de *O. sativa* exibem diferentes respostas, apresentando crescimento superior, inferior ou similar quando comparadas com seus respectivos controles. A sensibilidade da planta ao estresse pode variar entre diferentes espécies e, algumas vezes, até mesmo dentro de uma mesma espécie em diferentes estágios de desenvolvimento (Röth *et al.*, 2016). Dentre os acessos de *O. australiensis*, AUS1 e AUS7 apresentaram maior crescimento e uniformidade em suas respostas ao estresse, se diferenciando de outros acessos (Figura 7). Além disso, em estudos do perfil ionômico, os acessos AUS1 e AUS7 apresentaram elevadas concentrações de Fe e Zn em seus grãos (Figuras 6a, b), características desejáveis em programas de biofortificação, favorecendo assim a escolha dos acessos para estudos posteriores.

Ao longo dos próximos anos é esperado um aumento na temperatura global. Projeta-se que eventos como ondas de calor ou eventos de temperaturas extremas tornem-se mais frequentes e intensos (Ahmed *et al.*, 2019). Esses eventos poderão ocorrer em períodos curtos, podendo ser de dias ou até semanas, os quais podem apresentar um aumento na temperatura de até 5 °C acima das condições normais (Ahmed *et al.*, 2019). Levando em consideração o período de exposição, duração e impactos relacionados ao cultivo e adaptação de culturas frente ao estresse por calor, realizamos o experimento de alta temperatura por um período prolongado em *O. sativa* cv. Nipponbare, nos acessos AUS1 e AUS7 de *O. australiensis*, e MER1 de *O. meridionalis*. Após o período de recuperação, plantas NIPPO e MER1 submetidas ao estresse por calor de 45 °C apresentaram uma redução no crescimento quando comparadas com plantas mantidas em situação controle (Figuras 8a, c). Quando avaliados os acessos de *O. australiensis* (AUS1 e AUS7), essa redução de parte aérea não foi observada (Figuras 8a, c).

A redução no crescimento foliar em *O. sativa* e *O. meridionalis* submetidas à alta temperatura já foi descrito na literatura (Scafaro *et al.*, 2010; Scafaro *et al.*, 2016). Quando submetidas à temperatura de 45 °C por 24h, ocorre uma diminuição no comprimento da parte aérea de 91% em *O. sativa* e 47% em *O. meridionalis*, ambas em relação às plantas mantidas à 28 °C (Scafaro *et al.*, 2010). A diferença entre as espécies foi atribuída ao menor impacto sofrido no aparato fotossintético em *O. meridionalis* durante o estresse por calor. Foi demonstrado que *O. meridionalis* sofre uma regulação positiva da isoforma α da Rubisco ativase (RCA) e de várias enzimas relacionadas ao ciclo de Calvin (Scafaro *et al.*, 2010). Da mesma maneira, a manutenção do crescimento de *O. australiensis* foi correlacionado com a capacidade de sua RCA manter o estado de ativação estável sob estresse por calor (Scafaro *et al.*, 2016).

Quando avaliados os parâmetros fotossintéticos, observamos que as taxas de assimilação de CO₂ eram menores em acessos de *O. australiensis* quando comparados com NIPPO e MER1 sob temperatura de 28 °C (Figura 9a), resultados que também são evidenciados por Scafaro *et al.* (2016). Quando verificados durante o estresse por calor, observamos que AUS1 consegue manter a assimilação de CO₂ estável enquanto esse parâmetro parece aumentar em AUS7, o que provavelmente contribui para a melhor aclimação deste acesso. Sob estresse, NIPPO e MER1 exibem efeitos negativos e maiores variações nas respostas após 24h quando comparadas aos acessos de *O. australiensis* (Figura 9a), corroborando a ideia de que esta é uma resposta diretamente envolvida com o processo de aclimação das plantas. Considerando a condutância estomática, AUS1 apresentou valores menores quando comparado com outros acessos e genótipos, contudo apresentou maior estabilidade, enquanto AUS7 apresentou um aumento constante em suas taxas (Figura 9b). Esse aumento de forma mais intensa em AUS7, quando comparado aos demais acessos e genótipos podem estar relacionados à capacidade de manter suas condições fotossintéticas mais estáveis, favorecendo a aclimação a condições de temperaturas mais elevadas.

A eficiência do uso de água foi menor para os acessos de *O. australiensis* (Figura 9e), o que sugere que as plantas não possuem um mecanismo de economia e preservação do status hídrico. Sendo possível que tais respostas estejam associadas às condições de plena disponibilidade de água, uma vez que os experimentos foram realizados em hidroponia, conforme evidenciado também por Scafaro *et al.* (2016). Em geral, os resultados com base nos parâmetros fotossintéticos obtidos e medições de parte aérea não sugerem que MER1

seja termotolerante. Contudo, novos experimentos com outros acessos desta espécie seriam necessários para testar esta hipótese.

A observação de que acessos de *O. australiensis* aparentemente apresentam uma resposta mais estável, durante o estresse por calor prologando e sob curtos períodos de tempo de exposição pode representar uma estratégia de termotolerância interessante durante picos de ondas de calor, cada vez mais frequentes em decorrência das mudanças climáticas. Essa estabilidade na assimilação de CO₂ em *O. australiensis* é atribuída à capacidade de manutenção do estado ativo da Rubisco activase (RCA), apresentando 19 alterações de aminoácidos quando comparada com a RCA de *O. sativa* (Scafaro *et al.*, 2016). Essas mudanças estruturais presentes nos domínios terminais C e N proporcionam uma redução na flexibilidade conformacional da estrutura, reduzindo a ativação sob diferentes regimes de temperatura, melhorando a estabilidade térmica e ao mesmo tempo reduzindo sua atividade específica, quando comparada com RCA de *O. sativa* (Scafaro *et al.*, 2016; Scafaro *et al.*, 2018). Em muitas espécies, incluindo arroz, há um único gene RCA funcional que codifica duas isoformas de proteína com base no splicing alternativo do pré-mRNA em uma isoforma α maior e uma isoforma β menor (Nagarajan and Gill, 2018). Acredita-se que a regulação na expressão destas duas isoformas esteja envolvida com o nível de ativação do ciclo de Calvin em condições de alta temperatura, uma vez que apresentam regulação redox e níveis de expressão distintos nestas condições. Em *O. australiensis*, Scafaro *et al.* (2016) observou um aumento na razão da isoforma α em detrimento da isoforma β da RCA sob estresse por calor, sugerindo que este poderia ser um mecanismo para regular o ciclo de Calvin em resposta às mudanças redox relacionadas a danos do fotossistema, ao invés de apenas aumentar a atividade de RCA sob alta temperatura. Contudo esse mecanismo não foi elucidado completamente na espécie *O. australiensis*.

Estudos realizados por Mathan *et al.* (2020), demonstraram que a espécie *O. australiensis* é capaz de acumular mais biomassa, não apenas pela sua eficiência fotossintética, mas também pela maior atividade de clivagem da Sacarose Sintase seguida pela maior expressão de genes de Celulose Sintase no caule. Dessa maneira, essa espécie utiliza de forma mais eficiente os fotossintatos para síntese de carboidratos estruturais, o que resulta em maior biomassa. Observamos um maior acúmulo de biomassa em plantas AUS1 expostas ao estresse por calor quando comparadas com plantas mantidas em situação controle (Figuras 13a, b), sugerindo que esses mecanismos podem também promover

termotolerância. Entretanto, quando verificada a concentração de carboidratos solúveis totais, observamos que não houve diferença entre tratamento e controle tanto para AUS1 quanto NIPPO (Figura 14a).

Os resultados mostram que houve uma redução na concentração de amido em plantas submetidas ao estresse por calor para AUS1 e NIPPO, sendo que plantas de NIPPO tratadas sob alta temperatura sofreram uma maior redução na concentração quando comparadas com plantas controle (Figura 14b). É estabelecido que a redução da fotossíntese causada pelo estresse por calor leva a uma redução de sacarose nas folhas, ocasionando uma diminuição do seu carregamento no floema (Yuan *et al.*, 2017). Além disso, as atividades das principais enzimas de síntese do amido são suscetíveis ao estresse térmico, o que pode diminuir significativamente a síntese e o acúmulo do amido em folhas. Isso foi evidenciado em genótipos de mostarda (*Brassica campestris* L.), que, sob estresse de calor, apresentaram diminuição da atividade da enzima amilase e prejuízos no metabolismo de amido, afetado tanto em genótipos tolerantes quanto sensíveis (Yuan *et al.*, 2017). Devido à exposição a altas temperaturas, a capacidade de armazenamento em folhas torna-se reduzida em *O. sativa*, o que explicaria a capacidade reduzida de crescimento.

Apesar de dados relatando a espécie *O. australiensis* como termotolerante, muito sobre seus mecanismos associados a essa termotolerância ainda permanecem desconhecidos. Para desvendar tais mecanismos, serão realizadas análises de transcriptoma de plantas submetidas ao estresse por calor. Com isso, espera-se entender melhor os mecanismos, rotas e possíveis genes envolvidos na adaptação e tolerância de *O. australiensis* a altas temperaturas.

6 CONCLUSÕES

Neste trabalho, foi apresentado pela primeira vez o perfil ionômico de sementes e folhas da espécie selvagem de *O. australiensis*. Sendo possível concluir que ambas as espécies apresentam concentrações similares de macro e micronutrientes em folhas, contudo em grãos, a espécie *O. australiensis* apresenta concentrações elevadas de Fe e Zn e concentrações similares de metais como As e Cd quando comparadas com a espécie *O. sativa*. Entre os acessos de *O. australiensis*, AUS1 apresentou maiores concentrações de Fe e Zn quando verificado com os genótipos avaliados de *O. sativa*. Contudo serão necessários realizar estudos mais aprofundados para entender melhor os mecanismos de captação, translocação e armazenamento nos tecidos da planta. A variação na suscetibilidade ao estresse por calor entre as três espécies do gênero *Oryza* estudadas foram relacionadas com as suas capacidades de manterem suas taxas de crescimento e os parâmetros fotossintéticos estáveis. Entre as espécies, *O. australiensis* apresentou maior tolerância ao estresse, sendo que o acesso AUS1 exibiu taxa de crescimento normal, maior acúmulo de biomassa e parâmetros fotossintéticos estáveis durante o período de estresse por calor. Quando verificado o teor de amido, AUS1 apresentou menor redução quando comparado com o genótipo NIPPO de *O. sativa*. No entanto, os mecanismos associados e genes envolvidos na termotolerância ainda permanecem desconhecidos.

7 PERSPECTIVAS FUTURAS

Como perspectivas futuras, serão analisados o perfil ionômico de sementes e panículas expostas a alta temperaturas, com o intuito de verificar se o efeito da temperatura poderá afetar a disponibilidade e capacidade de armazenamento de macro e micronutrientes nas espécies de *O. australiensis* e *O. sativa*. Em conjunto, serão realizadas análises de transcriptomas dessas plantas durante o período de enchimento de grãos e emissão de panícula, com a finalidade de identificar os principais genes responsáveis pelo transporte e acúmulo em sementes da espécie selvagem.

O estudo da termotolerância do acesso AUS1 de *O. australiensis* será realizado através de análises de comparação dos transcriptomas de AUS1 e NIPPO durante o estresse por calor e durante a fase de recuperação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aghamolki MTK, Yusop MK, Oad FC, Zakikhani H, Jaafar HZ, Kharidah S and Musa MH (2014) Heat stress effects on yield parameters of selected rice cultivars at reproductive growth stages. *J. Food, Agric. Environ.* 12:

Ahmed I, Ullah A, ur Rahman MH, Ahmad B, Wajid SA, Ahmad A and Ahmed S (2019) Climate Change Impacts and Adaptation Strategies for Agronomic Crops. *Clim Chang Agric.* doi: 10.5772/intechopen.82697

Aiqing S, Somayanda I, Sebastian SV, Singh K, Gill K, Prasad PVV and Jagadish SVK (2018) Heat stress during flowering affects time of day of flowering, seed set, and grain quality in spring wheat. *Crop Sci.* doi: 10.2135/cropsci2017.04.0221

Åkerfelt M, Morimoto RI and Sistonen L (2010) Heat shock factors: Integrators of cell stress, development and lifespan. *Nat Rev Mol Cell Biol.* doi: 10.1038/nrm2938

Al-Ghussain L (2019) Global warming: review on driving forces and mitigation. *Environ Prog Sustain Energy* 38:13–21. doi: 10.1002/ep.13041

Al-Whaibi MH (2011) Plant heat-shock proteins: A mini review. *J King Saud Univ - Sci.* doi: 10.1016/j.jksus.2010.06.022

Alamri SA, Siddiqui MH, Al-Khaishany MY, Khan MN, Ali HM and Alakeel KA (2019) Nitric oxide-mediated cross-talk of proline and heat shock proteins induce thermotolerance in *Vicia faba* L. *Environ Exp Bot* 161:290–302. doi: 10.1016/j.envexpbot.2018.06.012

Allakhverdiev SI, Los DA, Mohanty P, Nishiyama Y and Murata N (2007) Glycinebetaine alleviates the inhibitory effect of moderate heat stress on the repair of photosystem II during photoinhibition. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg.* doi: 10.1016/j.bbabi.2007.10.005

Allen MR, O.P. Dube, Solecki W, Aragón-Durand F, Cramer W, Humphreys S, Kainuma M, Kala J, Mahowald N, Mulugetta Y et al. (2018) IPCC: Framing and Context.

Ashraf MA, Iqbal M, Rasheed R, Hussain I, Riaz M and Arif MS (2018) Environmental Stress and Secondary Metabolites in Plants: An Overview. *Plant Metab Regul under Environ Stress.* doi: 10.1016/B978-0-12-812689-9.00008-X

Asthir B, Koundal A and Bains NS (2012) Putrescine modulates antioxidant defense response in wheat under high temperature stress. *Biol Plant.* doi: 10.1007/s10535-012-0209-1

Atwell BJ, Wang H and Scafaro AP (2014) Could abiotic stress tolerance in wild relatives of rice be used to improve *Oryza sativa*? *Plant Sci.* doi: 10.1016/j.plantsci.2013.10.007

Balla K, Karsai I, Bónis P, Kiss T, Berki Z, Horváth Á, Mayer M, Bencze S and Veisz O (2019) Heat stress responses in a large set of winter wheat cultivars (*Triticum aestivum* L.) depend on the timing and duration of stress. *PLoS One.* doi: 10.1371/journal.pone.0222639

Ban Y, Zhang P, Nascetti A, Bevington AR and Wulder MA (2020) Near Real-Time Wildfire Progression Monitoring with Sentinel-1 SAR Time Series and Deep Learning. *Sci Rep.* doi: 10.1038/s41598-019-56967-x

Banerjee A and Roychoudhury A (2018) Small Heat Shock Proteins: Structural Assembly

and Functional Responses Against Heat Stress in Plants. *Plant Metabolites and Regulation under Environmental Stress*. Elsevier, pp 367–376

Barrera-Figueroa BE and Peña-Castro JM (2018) *Oryza granulata* Nees et Arn. ex Watt. doi: 10.1007/978-3-319-71997-9_12

Bartwal A, Mall R, Lohani P, Guru SK and Arora S (2013) Role of Secondary Metabolites and Brassinosteroids in Plant Defense Against Environmental Stresses. *J Plant Growth Regul.* doi: 10.1007/s00344-012-9272-x

Basha, O'Neill H and Vierling E (2013) Small heat shock proteins and α -crystallins: dynamic proteins with flexible functions. *37*:106–117. doi: 10.1016/j.tibs.2011.11.005.Small

Baxter I, Muthukumar B, Hyeong CP, Buchner P, Lahner B, Danku J, Zhao K, Lee J, Hawkesford MJ, Guerinot M Lou et al. (2008) Variation in molybdenum content across broadly distributed populations of *Arabidopsis thaliana* is controlled by a mitochondrial molybdenum transporter (MOT1). *PLoS Genet.* doi: 10.1371/journal.pgen.1000004

Bitra CE and Gerats T (2013) Plant tolerance to high temperature in a changing environment: Scientific fundamentals and production of heat stress-tolerant crops. *Front Plant Sci.* doi: 10.3389/fpls.2013.00273

Brar DS and Khush GS (2018) Wild Relatives of Rice: A Valuable Genetic Resource for Genomics and Breeding Research. doi: 10.1007/978-3-319-71997-9_1

Cai H, Huang S, Che J, Yamaji N and Ma JF (2019) The tonoplast-localized transporter OsHMA3 plays an important role in maintaining Zn homeostasis in rice. *J Exp Bot.* doi: 10.1093/jxb/erz091

Chan-Schamnet KY, Baniwal SK, Bublak D, Nover L and Scharf KD (2009) Specific interaction between tomato HsfA1 and HsfA2 creates hetero-oligomeric superactivator complexes for synergistic activation of heat stress gene expression. *J Biol Chem.* doi: 10.1074/jbc.M109.007336

Chao DY, Baraniecka P, Danku J, Koprivova A, Lahner B, Luo H, Yakubova E, Dilkes B, Kopriva S and Salt DE (2014) Variation in sulfur and selenium accumulation is controlled by naturally occurring isoforms of the key sulfur assimilation enzyme ADENOSINE 5'-PHOSPHOSULFATE REDUCTASE2 across the *Arabidopsis* species range. *Plant Physiol.* doi: 10.1104/pp.114.247825

Chauhan H, Khurana N, Agarwal P and Khurana P (2011) Heat shock factors in rice (*Oryza sativa* L.): Genome-wide expression analysis during reproductive development and abiotic stress. *Mol Genet Genomics.* doi: 10.1007/s00438-011-0638-8

Chavez-Arias CC, Ligarreto-Moreno GA and Restrepo-Díaz H (2018) Evaluation of heat stress period duration and the interaction of daytime temperature and cultivar on common bean. *Environ Exp Bot.* doi: 10.1016/j.envexpbot.2018.08.012

Chen D, Shao Q, Yin L, Younis A and Zheng B (2019) Polyamine function in plants: Metabolism, regulation on development, and roles in abiotic stress responses. *Front Plant Sci.* doi: 10.3389/fpls.2018.01945

Chen THH and Murata N (2011) Glycinebetaine protects plants against abiotic stress:

Mechanisms and biotechnological applications. *Plant, Cell Environ.* doi: 10.1111/j.1365-3040.2010.02232.x

Chen ZC and Ma JF (2013) Magnesium transporters and their role in Al tolerance in plants. *Plant Soil.* doi: 10.1007/s11104-012-1433-y

Cheng L, Sun RR, Wang FY, Peng Z, Kong FL, Wu J, Cao JS and Lu G (2012) Spermidine affects the transcriptome responses to high temperature stress in ripening tomato fruit. *J Zhejiang Univ Sci B.* doi: 10.1631/jzus.b1100060

Chowrasia S, Rawal HC, Mazumder A, Gaikwad K, Sharma TR, Singh NK and Mondal TK (2018) *Oryza coarctata* Roxb. doi: 10.1007/978-3-319-71997-9_8

Clemens S and Ma JF (2016) Toxic Heavy Metal and Metalloid Accumulation in Crop Plants and Foods. *Annu Rev Plant Biol.* doi: 10.1146/annurev-arplant-043015-112301

Cvikrová M, Gemperlová L, Dobrá J, Martincová O, Prásil IT, Gubis J and Vanková R (2012) Effect of heat stress on polyamine metabolism in proline-over-producing tobacco plants. *Plant Sci.* doi: 10.1016/j.plantsci.2011.01.016

da Silva R de CB, Araujo M do N, Ornellas FLS and Dantas BF (2018) Thermal stress and physiological changes in watermelon seeds. *Pesqui Agropecu Trop.* doi: 10.1590/1983-40632018v4850404

Dalmiya N and Schultink W (2003) Combating hidden hunger: The role of international agencies. *Food Nutr Bull.* doi: 10.1177/15648265030244s203

Descalsota GIL, Swamy BPM, Zaw H, Inabangan-Asilo MA, Amparado A, Mauleon R, Chadha-Mohanty P, Arocena EC, Raghavan C, Leung H et al. (2018) Genome-wide association mapping in a rice magic plus population detects qtls and genes useful for biofortification. *Front Plant Sci.* doi: 10.3389/fpls.2018.01347

Dikilitas M, Simsek E, Karakas S and Ahmad P (2019) High-Temperature Stress and Photosynthesis Under Pathological Impact. *Photosynth Product Environ Stress.* doi: 10.1002/9781119501800.ch3

Distéfano AM, Martin MV, Córdoba JP, Bellido AM, D'Ippólito S, Colman SL, Soto D, Roldán JA, Bartoli CG, Zabaleta EJ et al. (2017) Heat stress induces ferroptosis-like cell death in plants. *J Cell Biol.* doi: 10.1083/jcb.201605110

Du F, Liu P, Wang K, Yang Z and Wang L (2020) Ionic responses of rice plants to the stresses of different arsenic species in hydroponics. *Chemosphere.* doi: 10.1016/j.chemosphere.2019.125398

Edreva A, Yordanov I, Kardjieva R and Gesheva E (1998) Heat shock responses of bean plants: Involvement of free radicals, antioxidants and free radical/active oxygen scavenging systems. *Biol Plant.* doi: 10.1023/A:1001846009471

Elshenawy MM and Elgamal WH (2018) *Oryza ridleyi* Hook. F. doi: 10.1007/978-3-319-71997-9_24

Enstone DE, Peterson CA and Ma F (2002) Root endodermis and exodermis: Structure, function, and responses to the environment. *J Plant Growth Regul.* doi: 10.1007/s00344-003-0002-2

- Fahad S, Adnan M, Noor M, Arif M, Alam M, Khan IA, Ullah H, Wahid F, Mian IA, Jamal Y et al. (2018) Major constraints for global rice production. *Advances in Rice Research for Abiotic Stress Tolerance*. Elsevier, pp 1–22
- FAO (2018) The future of food and agriculture – Alternative pathways to 2050 | Global Perspectives Studies | Food and Agriculture Organization of the United Nations. *Food Agric Organ* 224.
- Ganie SA, Molla KA, Henry RJ, Bhat K V. and Mondal TK (2019) Advances in understanding salt tolerance in rice. *Theor Appl Genet*. doi: 10.1007/s00122-019-03301-8
- Gireesh C (2018) *Oryza alta* Swollen. doi: 10.1007/978-3-319-71997-9_4
- Giri J (2011) Glycinebetaine and abiotic stress tolerance in plants. *Plant Signal Behav* 6:1746–1751. doi: 10.4161/psb.6.11.17801
- Guo M, Liu JH, Ma X, Luo DX, Gong ZH and Lu MH (2016) The plant heat stress transcription factors (HSFS): Structure, regulation, and function in response to abiotic stresses. *Front Plant Sci*. doi: 10.3389/fpls.2016.00114
- Gururani MA, Venkatesh J and Tran LSP (2015) Regulation of photosynthesis during abiotic stress-induced photoinhibition. *Mol Plant*. doi: 10.1016/j.molp.2015.05.005
- Hall A (2000) Crop Developmental Responses to Temperature, Photoperiod, and Light Quality. *Crop Responses to Environ*. doi: 10.1201/9781420041088.ch6
- Hall AE and Hall AE (2018) Crop Developmental Responses to Temperature, Photoperiod, and Light Quality. *Crop Responses to Environ*. doi: 10.1201/9781315147130-6
- Hamzelou S, Kamath KS, Masoomi-Aladizgeh F, Johnsen MM, Atwell BJ and Haynes PA (2020) Wild and cultivated species of rice have distinctive proteomic responses to drought. *Int J Mol Sci*. doi: 10.3390/ijms21175980
- Harsh A, Sharma YK, Joshi U, Rampuria S, Singh G, Kumar S and Sharma R (2016) Effect of short-term heat stress on total sugars, proline and some antioxidant enzymes in moth bean (*Vigna aconitifolia*). *Ann Agric Sci*. doi: 10.1016/j.aos.2016.02.001
- Hasanuzzaman M, Banerjee A, Borhannuddin Bhuyan MHM, Roychoudhury A, Al Mahmud J and Fujita M (2019) Targeting glycinebetaine for abiotic stress tolerance in crop plants: Physiological mechanism, molecular interaction and signaling. *Phyton (B Aires)*. doi: 10.32604/phyton.2019.07559
- Hasanuzzaman M, Nahar K, Alam MM, Roychowdhury R and Fujita M (2013) Physiological, biochemical, and molecular mechanisms of heat stress tolerance in plants. *Int J Mol Sci*. doi: 10.3390/ijms14059643
- Havaux M (1998) Carotenoids as membrane stabilizers in chloroplasts. *Trends Plant Sci*. doi: 10.1016/S1360-1385(98)01200-X
- Henry RJ (2018) *Oryza australiensis* Domin. doi: 10.1007/978-3-319-71997-9_5
- Henry RJ (2019) Australian Wild Rice Populations: A Key Resource for Global Food Security. *Front Plant Sci*. doi: 10.3389/fpls.2019.01354
- Henry RJ, Rice N, Waters DLE, Kasem S, Ishikawa R, Hao Y, Dillon S, Crayn D, Wing R

- and Vaughan D (2010) Australian *Oryza*: Utility and conservation. *Rice*. doi: 10.1007/s12284-009-9034-y
- Hoegh-Guldberg O, Jacob D and Taylor M (2018) 2018: Impacts of 1.5°C Global Warming on Natural and Human Systems. In: *Global Warming of 1.5°C. 2018 Impacts 1.5°C Glob. Warm. Nat. Hum. Syst. Glob. Warm. 1.5°C*
- Hu S, Ding Y and Zhu C (2020) Sensitivity and Responses of Chloroplasts to Heat Stress in Plants. *Front Plant Sci*. doi: 10.3389/fpls.2020.00375
- Huang S, Sasaki A, Yamaji N, Okada H, Mitani-Ueno N and Ma JF (2020a) The ZIP transporter family member OsZIP9 contributes to root zinc uptake in rice under zinc-limited conditions. *Plant Physiol*. doi: 10.1104/pp.20.00125
- Huang S, Wang P, Yamaji N and Ma JF (2020b) Plant Nutrition for Human Nutrition: Hints from Rice Research and Future Perspectives. *Mol Plant*. doi: 10.1016/j.molp.2020.05.007
- Huang XY and Salt DEE (2016) Plant Ionomics: From Elemental Profiling to Environmental Adaptation. *Mol Plant*. doi: 10.1016/j.molp.2016.05.003
- Hussain HA, Men S, Hussain S, Chen Y, Ali S, Zhang S, Zhang K, Li Y, Xu Q, Liao C et al. (2019) Interactive effects of drought and heat stresses on morpho-physiological attributes, yield, nutrient uptake and oxidative status in maize hybrids. *Sci Rep*. doi: 10.1038/s41598-019-40362-7
- IPCC (2014) Summary for Policymakers, In: *Climate Change 2014, Mitigation of Climate Change. Contribution of Working Group III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*.
- Ishikawa R, Iwata M, Taniko K, Monden G, Miyazaki N, Orn C, Tsujimura Y, Yoshida S, Ma JF and Ishii T (2017) Detection of quantitative trait loci controlling grain zinc concentration using Australian wild rice, *Oryza meridionalis*, a potential genetic resource for biofortification of rice. *PLoS One*. doi: 10.1371/journal.pone.0187224
- Jing J, Guo S, Li Y and Li W (2020) The alleviating effect of exogenous polyamines on heat stress susceptibility of different heat resistant wheat (*Triticum aestivum* L.) varieties. *Sci Rep*. doi: 10.1038/s41598-020-64468-5
- Kasem S, Waters DLE and Henry RJ (2012) Analysis of Starch Gene Diversity in the Wild Relatives of *Oryza sativa*. *Trop Plant Biol*. doi: 10.1007/s12042-012-9111-z
- Kaushal N, Bhandari K, Siddique KHM and Nayyar H (2016) Food crops face rising temperatures: An overview of responses, adaptive mechanisms, and approaches to improve heat tolerance. *Cogent Food Agric*. doi: 10.1080/23311932.2015.1134380
- Keeley JE, van Mantgem P and Falk DA (2019) Fire, climate and changing forests. *Nat Plants*. doi: 10.1038/s41477-019-0485-x
- Kennedy G and Burlingame B (2003) Analysis of food composition data on rice from a plant genetic resources perspective. *Food Chem*. doi: 10.1016/S0308-8146(02)00507-1
- Khan and Shahwar (2020) Role of Heat Shock Proteins (HSPs) and Heat Stress Tolerance in Crop Plants. *Sustain Agric Era Clim Chang*. doi: 10.1007/978-3-030-45669-6

- Kilasi NL, Singh J, Vallejos CE, Ye C, Jagadish SVK, Kusolwa P and Rathinasabapathi B (2018) Heat stress tolerance in rice (*Oryza sativa* L.): Identification of quantitative trait loci and candidate genes for seedling growth under heat stress. *Front Plant Sci.* doi: 10.3389/fpls.2018.01578
- Koochak H, Puthiyaveetil S, Mullendore DL, Li M and Kirchhoff H (2019) The structural and functional domains of plant thylakoid membranes. *Plant J.* doi: 10.1111/tpj.14127
- Kotak S, Larkindale J, Lee U, von Koskull-Döring P, Vierling E and Scharf KD (2007) Complexity of the heat stress response in plants. *Curr Opin Plant Biol.* doi: 10.1016/j.pbi.2007.04.011
- Kumagai M, Tanaka T, Ohyanagi H, Hsing YIC and Itoh T (2018) Genome sequences of *Oryza* species. *Rice Genomics, Genet Breed.* doi: 10.1007/978-981-10-7461-5_1
- Kumar (2012) Protection against heat stress in wheat involves change in cell membrane stability, antioxidant enzymes, osmolyte, H₂O₂ and transcript of heat shock protein. *Int J Plant Physiol Biochem.* doi: 10.5897/ijppb12.008
- Kweku D, Bismark O, Maxwell A, Desmond K, Danso K, Oti-Mensah E, Quachie A and Adormaa B (2018) Greenhouse Effect: Greenhouse Gases and Their Impact on Global Warming. *J Sci Res Reports.* doi: 10.9734/jsrr/2017/39630
- Lahner B, Gong J, Mahmoudian M, Smith EL, Abid KB, Rogers EE, Guerinot ML, Harper JF, Ward JM, McIntyre L et al. (2003) Genomic scale profiling of nutrient and trace elements in *Arabidopsis thaliana*. *Nat Biotechnol.* doi: 10.1038/nbt865
- Lamaoui M, Jemo M, Datla R and Bekkaoui F (2018) Heat and drought stresses in crops and approaches for their mitigation. *Front Chem.* doi: 10.3389/fchem.2018.00026
- Lamers J, Der Meer T Van and Testerink C (2020) How plants sense and respond to stressful environments. *Plant Physiol.* doi: 10.1104/PP.19.01464
- Li S, Zhou X, Chen L, Huang W and Yu D (2010) Functional characterization of *Arabidopsis thaliana* WRKY39 in heat stress. *Mol Cells.* doi: 10.1007/s10059-010-0059-2
- Liu H chin and Charng Y yung (2013) Common and distinct functions of *Arabidopsis* class A1 and A2 heat shock factors in diverse abiotic stress responses and development. *Plant Physiol.* doi: 10.1104/pp.113.221168
- Liu HC, Liao HT and Charng YY (2011) The role of class A1 heat shock factors (HSFA1s) in response to heat and other stresses in *Arabidopsis*. *Plant, Cell Environ.* doi: 10.1111/j.1365-3040.2011.02278.x
- Liu JX and Howell SH (2016) Managing the protein folding demands in the endoplasmic reticulum of plants. *New Phytol.* doi: 10.1111/nph.13915
- Liu M, Zhu J and Dong Z (2020) Immediate transcriptional responses of *Arabidopsis* leaves to heat shock. *J Integr Plant Biol.* doi: 10.1111/jipb.12990
- Maathuis FJ (2009) Physiological functions of mineral macronutrients. *Curr Opin Plant Biol* 12:250–258. doi: 10.1016/j.pbi.2009.04.003
- Mathan J, Singh A and Ranjan A (2020) Vascular features, sucrose transport and Sucrose

- Synthase activity contribute to the differential source-sink relationship between a cultivated and a wild rice. bioRxiv 2020.10.03.324889.
- Mayer MP (2010) Gymnastics of molecular chaperones. Mol Cell. doi: 10.1016/j.molcel.2010.07.012
- McLoughlin F, Basha E, Fowler ME, Kim M, Bordowitz J, Katiyar-Agarwal S and Vierling E (2016) Class I and II small heat shock proteins together with HSP101 protect protein translation factors during heat stress. Plant Physiol. doi: 10.1104/pp.16.00536
- Menguer PK, Sperotto RA and Ricachenevsky FK (2017) A walk on the wild side: *Oryza* species as source for rice abiotic stress tolerance. Genet Mol Biol. doi: 10.1590/1678-4685-gmb-2016-0093
- Mittler R, Finka A and Goloubinoff P (2012) How do plants feel the heat? Trends Biochem Sci. doi: 10.1016/j.tibs.2011.11.007
- Moner AM and Henry RJ (2018) *Oryza meridionalis* N.Q.Ng. doi: 10.1007/978-3-319-71997-9_16
- Mostofa MG, Yoshida N and Fujita M (2014) Spermidine pretreatment enhances heat tolerance in rice seedlings through modulating antioxidative and glyoxalase systems. Plant Growth Regul. doi: 10.1007/s10725-013-9865-9
- Moura L and Landau EC (2018) Evolução da Produção de Arroz.
- Mu S, Yamaji N, Sasaki A, Le L, Du B, Che J, Shi H, Zhao H, Huang S, Deng F et al. (2020) A transporter for delivering zinc to the developing tiller bud and panicle in rice. Plant J. doi: 10.1111/tpj.15073
- Munns R and Tester M (2008) Mechanisms of salinity tolerance. Annu Rev Plant Biol. doi: 10.1146/annurev.arplant.59.032607.092911
- Murmu S, Murmu K, Bera PS and Kundu CK (2017) Exogenous Proline and Glycine Betaine in Plants under Stress Tolerance. Int J Curr Microbiol Appl Sci. doi: 10.20546/ijcmas.2017.609.109
- Muthusamy SK, Dalal M, Chinnusamy V and Bansal KC (2017) Genome-wide identification and analysis of biotic and abiotic stress regulation of small heat shock protein (HSP20) family genes in bread wheat. J Plant Physiol. doi: 10.1016/j.jplph.2017.01.004
- Nagarajan R and Gill KS (2018) Evolution of Rubisco activase gene in plants. Plant Mol Biol. doi: 10.1007/s11103-017-0680-y
- Nayyar H, Kaur R, Kaur S and Singh R (2014) γ -Aminobutyric Acid (GABA) Imparts Partial Protection from Heat Stress Injury to Rice Seedlings by Improving Leaf Turgor and Upregulating Osmoprotectants and Antioxidants. J Plant Growth Regul. doi: 10.1007/s00344-013-9389-6
- Naz N, Durrani F, Shah Z, Khan NA and Ullah I (2018) Influence of heat stress on growth and physiological activities of potato (*Solanum tuberosum* L.). Phyton (B Aires). doi: 10.32604/phyton.2018.87.225

- Norton GJ, Deacon CM, Xiong L, Huang S, Meharg AA and Price AH (2010) Genetic mapping of the rice ionome in leaves and grain: Identification of QTLs for 17 elements including arsenic, cadmium, iron and selenium. *Plant Soil*. doi: 10.1007/s11104-009-0141-8
- Ohama N, Kusakabe K, Mizoi J, Zhao H, Kidokoro S, Koizumi S, Takahashi F, Ishida T, Yanagisawa S, Shinozaki K et al. (2016) The transcriptional cascade in the heat stress response of arabidopsis is strictly regulated at the level of transcription factor expression. *Plant Cell* 28:181–201. doi: 10.1105/tpc.15.00435
- Oktyabrskiy VP (2016) A new opinion of the greenhouse effect. *St Petersburg Polytech Univ J Phys Math*. doi: 10.1016/j.spjpm.2016.05.008
- Palmgren MG, Edenbrandt AK, Vedel SE, Andersen MM, Landes X, Østerberg JT, Falhof J, Olsen LI, Christensen SB, Sandøe P et al. (2015) Are we ready for back-to-nature crop breeding? *Trends Plant Sci*. doi: 10.1016/j.tplants.2014.11.003
- Pansarakham P, Pongdontri P, Theerakulpisut P and Dongsansuk A (2018) Effect of short-term heat exposure on physiological traits of indica rice at grain-filling stage. *Acta Physiol Plant*. doi: 10.1007/s11738-018-2743-3
- Paul P, Dhatt BK, Sandhu J, Hussain W, Irvin L, Morota G, Staswick P and Walia H (2020) Divergent phenotypic response of rice accessions to transient heat stress during early seed development. *Plant Direct*. doi: 10.1002/pld3.196
- Pfeiffer WH and McClafferty B (2008) Biofortification: Breeding Micronutrient-Dense Crops. *Breed Major Food Staples*. doi: 10.1002/9780470376447.ch3
- Pfleiderer P, Schleussner CF, Kornhuber K and Coumou D (2019) Summer weather becomes more persistent in a 2 °C world. *Nat Clim Chang*. doi: 10.1038/s41558-019-0555-0
- Piegu B, Guyot R, Picault N, Roulin A, Saniyal A, Kim H, Collura K, Brar DS, Jackson S, Wing RA et al. (2006) Doubling genome size without polyploidization: Dynamics of retrotransposition-driven genomic expansions in *Oryza australiensis*, a wild relative of rice. *Genome Res*. doi: 10.1101/gr.5290206
- Prasad R, Shivay YS and Kumar D (2017) Current status, challenges, and opportunities in rice production. *Rice Prod Worldw*. doi: 10.1007/978-3-319-47516-5_1
- Priya M, Sharma L, Kaur R, Bindumadhava H, Nair RM, Siddique KHM and Nayyar H (2019) GABA (γ -aminobutyric acid), as a thermo-protectant, to improve the reproductive function of heat-stressed mungbean plants. *Sci Rep* 9:1–14. doi: 10.1038/s41598-019-44163-w
- Qu AL, Ding YF, Jiang Q and Zhu C (2013) Molecular mechanisms of the plant heat stress response. *Biochem Biophys Res Commun*. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.01.104
- Ray DK, West PC, Clark M, Gerber JS, Prishchepov A V. and Chatterjee S (2019) Climate change has likely already affected global food production. *PLoS One*. doi: 10.1371/journal.pone.0217148
- Ray S, Vijayan J, Chakraborti M, Sarkar S, Bose LK and Singh ON (2018) *Oryza officinalis* Complex. doi: 10.1007/978-3-319-71997-9_21

- Ricachenevsky FK, Buffon G, Schwambach J and Sperotto RA (2018) *Oryza brachyantha* A. Chev. et Roehr. doi: 10.1007/978-3-319-71997-9_7
- Ricachenevsky FK and Sperotto RA (2016) Into the wild: *Oryza* species as sources for enhanced nutrient accumulation and metal tolerance in rice. *Front Plant Sci.* doi: 10.3389/fpls.2016.00974
- Ricachenevsky FK, Sperotto RA, Menguer PK, Sperb ER, Lopes KL and Fett JP (2011) ZINC-INDUCED FACILITATOR-LIKE family in plants: Lineage-specific expansion in monocotyledons and conserved genomic and expression features among rice (*Oryza sativa*) paralogs. *BMC Plant Biol.* doi: 10.1186/1471-2229-11-20
- Riebeek H (2010) NASA Earth Observatory: Global Warming. In: NASA Earth Obs.
- Rivero RM, Ruiz JM, García PC, López-Lefebvre LR, Sánchez E and Romero L (2001) Resistance to cold and heat stress: Accumulation of phenolic compounds in tomato and watermelon plants. *Plant Sci.* doi: 10.1016/S0168-9452(00)00395-2
- Rizhsky L, Liang H, Shuman J, Shulaev V, Davletova S and Mittler R (2004) When defense pathways collide. The response of arabidopsis to a combination of drought and heat stress 1[w]. *Plant Physiol.* doi: 10.1104/pp.103.033431
- Rogelj J, Popp A, Calvin K V., Luderer G, Emmerling J, Gernaat D, Fujimori S, Strefler J, Hasegawa T, Marangoni G et al. (2018) Scenarios towards limiting global mean temperature increase below 1.5 °c. *Nat Clim Chang.* doi: 10.1038/s41558-018-0091-3
- Röth S, Paul P and Fragkostefanakis S (2016) Plant heat stress response and thermotolerance. *Genet Manip Plants Mitig Clim Chang.* doi: 10.1007/978-81-322-2662-8_2
- Ruan YL, Jin Y, Yang YJ, Li GJ and Boyer JS (2010) Sugar input, metabolism, and signaling mediated by invertase: Roles in development, yield potential, and response to drought and heat. *Mol Plant.* doi: 10.1093/mp/ssq044
- Ruberti I, Sessa G, Ciolfi A, Possenti M, Carabelli M and Morelli G (2012) Plant adaptation to dynamically changing environment: The shade avoidance response. *Biotechnol Adv.* doi: 10.1016/j.biotechadv.2011.08.014
- Sajid M, Rashid B, Ali Q and Husnain T (2018) Mechanisms of heat sensing and responses in plants. It is not all about Ca²⁺ ions. *Biol Plant.* doi: 10.1007/s10535-018-0795-2
- Salt DE, Baxter I and Lahner B (2008) Ionomics and the study of the plant ionome. *Annu Rev Plant Biol.* doi: 10.1146/annurev.arplant.59.032607.092942
- Sarker M, Pani DR and Mondal TK (2018) *Oryza longiglumis* Jansen. doi: 10.1007/978-3-319-71997-9_14
- Sasaki A, Yamaji N and Ma JF (2016) Transporters involved in mineral nutrient uptake in rice. *J Exp Bot.* doi: 10.1093/jxb/erw060
- Sasaki A, Yamaji N, Mitani-Ueno N, Kashino M and Ma JF (2015) A node-localized transporter OsZIP3 is responsible for the preferential distribution of Zn to developing tissues in rice. *Plant J.* doi: 10.1111/tbj.13005

- Sasaki A, Yamaji N, Yokosho K and Ma JF (2012) Nramp5 is a major transporter responsible for manganese and cadmium uptake in rice. *Plant Cell*. doi: 10.1105/tpc.112.096925
- Scafaro AP, Atwell BJ, Muylaert S, Reusel B Van, Ruiz GA, Rie J Van and Gallé A (2018) A thermotolerant variant of rubisco activase from a wild relative improves growth and seed yield in rice under heat stress. *Front Plant Sci*. doi: 10.3389/fpls.2018.01663
- Scafaro AP, Gallé A, Van Rie J, Carmo-Silva E, Salvucci ME and Atwell BJ (2016) Heat tolerance in a wild *Oryza* species is attributed to maintenance of Rubisco activation by a thermally stable Rubisco activase ortholog. *New Phytol*. doi: 10.1111/nph.13963
- Scafaro AP, Haynes PA and Atwell BJ (2010) Physiological and molecular changes in *Oryza meridionalis* Ng., a heat-tolerant species of wild rice. *J Exp Bot*. doi: 10.1093/jxb/erp294
- Scharf KD, Berberich T, Ebersberger I and Nover L (2012) The plant heat stress transcription factor (Hsf) family: Structure, function and evolution. *Biochim Biophys Acta - Gene Regul Mech*. doi: 10.1016/j.bbagr.2011.10.002
- Sengupta A, Chakraborty M, Saha J, Gupta B and Gupta K (2015) Polyamines: Osmoprotectants in plant abiotic stress adaptation. *Osmolytes Plants Acclim to Chang Environ Emerg Omi Technol*. doi: 10.1007/978-81-322-2616-1_7
- Senoura T, Sakashita E, Kobayashi T, Takahashi M, Aung MS, Masuda H, Nakanishi H and Nishizawa NK (2017) The iron-chelate transporter OsYSL9 plays a role in iron distribution in developing rice grains. *Plant Mol Biol*. doi: 10.1007/s11103-017-0656-y
- Shahid M, Saleem MF, Anjum SA and Afzal I (2017) Effect of terminal heat stress on proline, secondary metabolites and yield components of wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes. *Philipp. Agric. Sci*. 100:
- Sharma A, Kumar V, Shahzad B, Ramakrishnan M, Singh Sidhu GP, Bali AS, Handa N, Kapoor D, Yadav P, Khanna K et al. (2020a) Photosynthetic Response of Plants Under Different Abiotic Stresses: A Review. *J Plant Growth Regul*. doi: 10.1007/s00344-019-10018-x
- Sharma L, Priya M, Kaushal N, Bhandhari K, Chaudhary S, Dhankher OP, Prasad PVV, Siddique KHM and Nayyar H (2020b) Plant growth-regulating molecules as thermoprotectants: Functional relevance and prospects for improving heat tolerance in food crops. *J Exp Bot*. doi: 10.1093/jxb/erz333
- Shibagaki N, Rose A, McDermott JP, Fujiwara T, Hayashi H, Yoneyama T and Davies JP (2002) Selenate-resistant mutants of *Arabidopsis thaliana* identify Sultr1;2, a sulfate transporter required for efficient transport of sulfate into roots. *Plant J*. doi: 10.1046/j.0960-7412.2001.01232.x
- Sloat LL, Davis SJ, Gerber JS, Moore FC, Ray DK, West PC and Mueller ND (2020) Climate adaptation by crop migration. *Nat Commun*. doi: 10.1038/s41467-020-15076-4
- Sperotto RA, Ricachenevsky FK, Waldow V de A and Fett JP (2012) Iron biofortification in rice: It's a long way to the top. *Plant Sci*. doi: 10.1016/j.plantsci.2012.03.004
- Stein JC, Yu Y, Copetti D, Zwickl DJ, Zhang L, Zhang C, Chougule K, Gao D, Iwata A,

- Goicoechea JL et al. (2018) Genomes of 13 domesticated and wild rice relatives highlight genetic conservation, turnover and innovation across the genus *Oryza*. *Nat Genet.* doi: 10.1038/s41588-018-0040-0
- Surabhi GK and Seth JK (2020) Exploring In-built Defense Mechanisms in Plants under Heat Stress. *Heat Stress Toler Plants.* doi: 10.1002/9781119432401.ch11
- Suzuki N, Miller G, Morales J, Shulaev V, Torres MA and Mittler R (2011) Respiratory burst oxidases: The engines of ROS signaling. *Curr Opin Plant Biol.* doi: 10.1016/j.pbi.2011.07.014
- Takahashi H, Buchner P, Yoshimoto N, Hawkesford MJ and Shiu SH (2012a) Evolutionary relationships and functional diversity of plant sulfate transporters. *Front Plant Sci.* doi: 10.3389/fpls.2011.00119
- Takahashi R, Ishimaru Y, Senoura T, Shimo H, Ishikawa S, Arao T, Nakanishi H and Nishizawa NK (2011) The OsNRAMP1 iron transporter is involved in Cd accumulation in rice. *J Exp Bot.* doi: 10.1093/jxb/err136
- Takahashi R, Ishimaru Y, Shimo H, Ogo Y, Senoura T, Nishizawa NK and Nakanishi H (2012b) The OsHMA2 transporter is involved in root-to-shoot translocation of Zn and Cd in rice. *Plant, Cell Environ.* doi: 10.1111/j.1365-3040.2012.02527.x
- Takahashi S and Murata N (2008) How do environmental stresses accelerate photoinhibition? *Trends Plant Sci.* doi: 10.1016/j.tplants.2008.01.005
- Tian J, Wang LP, Yang YJ, Sun J and Guo SR (2012) Exogenous spermidine alleviates the oxidative damage in cucumber seedlings subjected to high temperatures. *J Am Soc Hortic Sci.* doi: 10.21273/jashs.137.1.11
- Tikapunya T, Fox G, Furtado A and Henry R (2017a) Grain physical characteristic of the Australian wild rices. *Plant Genet Resour Characterisation Util.* doi: 10.1017/S1479262116000083
- Tikapunya T, Zou W, Yu W, Powell PO, Fox GP, Furtado A, Henry RJ and Gilbert RG (2017b) Molecular structures and properties of starches of Australian wild rice. *Carbohydr Polym.* doi: 10.1016/j.carbpol.2017.05.046
- Trenberth KE and Fasullo JT (2009) Global warming due to increasing absorbed solar radiation. *Geophys Res Lett.* doi: 10.1029/2009GL037527
- Uraguchi S, Kamiya T, Sakamoto T, Kasai K, Sato Y, Nagamura Y, Yoshida A, Kyojuka J, Ishikawa S and Fujiwara T (2011) Low-affinity cation transporter (OsLCT1) regulates cadmium transport into rice grains. *Proc Natl Acad Sci U S A.* doi: 10.1073/pnas.1116531109
- Vasseur F, Pantin F and Vile D (2011) Changes in light intensity reveal a major role for carbon balance in *Arabidopsis* responses to high temperature. *Plant, Cell Environ.* doi: 10.1111/j.1365-3040.2011.02353.x
- Vile D, Pervent M, Belluau M, Vasseur F, Bresson J, Muller B, Granier C and Simonneau T (2012) *Arabidopsis* growth under prolonged high temperature and water deficit: Independent or interactive effects? *Plant, Cell Environ.* doi: 10.1111/j.1365-3040.2011.02445.x

- Vinod KK (2016) Enhancing nutrient starvation tolerance in rice. *Genet Manip Plants Mitig Clim Chang*. doi: 10.1007/978-81-322-2662-8_6
- Wahid A (2007) Physiological implications of metabolite biosynthesis for net assimilation and heat-stress tolerance of sugarcane (*Saccharum officinarum*) sprouts. *J Plant Res*. doi: 10.1007/s10265-006-0040-5
- Wairich A, de Oliveira BHN, Arend EB, Duarte GL, Ponte LR, Sperotto RA, Ricachenevsky FK and Fett JP (2019) The Combined Strategy for iron uptake is not exclusive to domesticated rice (*Oryza sativa*). *Sci Rep*. doi: 10.1038/s41598-019-52502-0
- Wakeel A, Farooq M, Bashir K and Ozturk L (2018) Micronutrient Malnutrition and Biofortification: Recent Advances and Future Perspectives. *Plant Micronutr Use Effic Mol Genomic Perspect Crop Plants*. doi: 10.1016/B978-0-12-812104-7.00017-4
- Wang GP, Li F, Zhang J, Zhao MR, Hui Z and Wang W (2010) Overaccumulation of glycine betaine enhances tolerance of the photosynthetic apparatus to drought and heat stress in wheat. *Photosynthetica*. doi: 10.1007/s11099-010-0006-7
- Wang P, Yamaji N, Inoue K, Mochida K and Ma JF (2020) Plastic transport systems of rice for mineral elements in response to diverse soil environmental changes. *New Phytol*. doi: 10.1111/nph.16335
- Wang QL, Chen JH, He NY and Guo FQ (2018a) Metabolic reprogramming in chloroplasts under heat stress in plants. *Int J Mol Sci*. doi: 10.3390/ijms19030849
- Wang SY and Camp MJ (2000) Temperatures after bloom affect plant growth and fruit quality of strawberry. *Sci Hortic (Amsterdam)*. doi: 10.1016/S0304-4238(99)00143-0
- Wang X, Hou L, Lu Y, Wu B, Gong X, Liu M, Wang J, Sun Q, Vierling E and Xu S (2018b) Metabolic adaptation of wheat grain contributes to a stable filling rate under heat stress. *J Exp Bot*. doi: 10.1093/jxb/ery303
- Wang X and Huang B (2017) Lipid- and calcium-signaling regulation of HsfA2c-mediated heat tolerance in tall fescue. *Environ Exp Bot*. doi: 10.1016/j.envexpbot.2017.01.008
- Wang X, Huang W, Yang Z, Liu J and Huang B (2016) Transcriptional regulation of heat shock proteins and ascorbate peroxidase by CtHsfA2b from African bermudagrass conferring heat tolerance in *Arabidopsis*. *Sci Rep*. doi: 10.1038/srep28021
- Waters ER (2013) The evolution, function, structure, and expression of the plant sHSPs. *J Exp Bot*. doi: 10.1093/jxb/ers355
- Wessells KR, Singh GM and Brown KH (2012) Estimating the Global Prevalence of Inadequate Zinc Intake from National Food Balance Sheets: Effects of Methodological Assumptions. *PLoS One*. doi: 10.1371/journal.pone.0050565
- White PJ and Broadley MR (2003) Calcium in plants. *Ann Bot*. doi: 10.1093/aob/mcg164
- Wing RA, Purugganan MD and Zhang Q (2018) The rice genome revolution: From an ancient grain to Green Super Rice. *Nat Rev Genet*. doi: 10.1038/s41576-018-0024-z
- Wu Y, Hu Y and Xu G (2009) Interactive effects of potassium and sodium on root growth and expression of K/Na transporter genes in rice. *Plant Growth Regul*. doi:

10.1007/s10725-008-9345-9

Wu Z and Ge S (2016) The whole chloroplast genome of wild rice (*Oryza australiensis*). Mitochondrial DNA. doi: 10.3109/19401736.2014.928868

Xalxo R, Yadu B, Chandra J, Chandrakar V and Keshavkant S (2020) Alteration in Carbohydrate Metabolism Modulates Thermotolerance of Plant under Heat Stress. *Heat Stress Toler Plants*. doi: 10.1002/9781119432401.ch5

Xue GP, Drenth J and McIntyre CL (2015) TaHsfA6f is a transcriptional activator that regulates a suite of heat stress protection genes in wheat (*Triticum aestivum* L.) including previously unknown Hsf targets. *J Exp Bot*. doi: 10.1093/jxb/eru462

Yaduvanshi A, Zaroug M, Bendapudi R and New M (2019) Impacts of 1.5 °C and 2 °C global warming on regional rainfall and temperature change across India. *Environ Res Commun*. doi: 10.1088/2515-7620/ab4ee2

Yamaji N, Xia J, Mitani-Ueno N, Yokosho K and Ma JF (2013) Preferential delivery of zinc to developing tissues in rice is mediated by P-type heavy metal ATPase OsHMA2. *Plant Physiol*. doi: 10.1104/pp.113.216564

Yang L, Wen KS, Ruan X, Zhao YX, Wei F and Wang Q (2018) Response of plant secondary metabolites to environmental factors. *Molecules*. doi: 10.3390/molecules23040762

Yang X, Liang Z and Lu C (2005) Genetic engineering of the biosynthesis of glycinebetaine enhances photosynthesis against high temperature stress in transgenic tobacco plants. *Plant Physiol*. doi: 10.1104/pp.105.063164

Yokosho K, Yamaji N and Ma JF (2016) OsFRDL1 expressed in nodes is required for distribution of iron to grains in rice. *J Exp Bot*. doi: 10.1093/jxb/erw314

Yokotani N, Ichikawa T, Kondou Y, Matsui M, Hirochika H, Iwabuchi M and Oda K (2008) Expression of rice heat stress transcription factor OsHsfA2e enhances tolerance to environmental stresses in transgenic *Arabidopsis*. *Planta* 227:957–967. doi: 10.1007/s00425-007-0670-4

Yoshida S, Forno DA, Cock JH and Gomez KA (1976) Routine procedure for growing rice plants in culture solution.

Yoshida T, Ohama N, Nakajima J, Kidokoro S, Mizoi J, Nakashima K, Maruyama K, Kim JM, Seki M, Todaka D et al. (2011) *Arabidopsis* HsfA1 transcription factors function as the main positive regulators in heat shock-responsive gene expression. *Mol Genet Genomics*. doi: 10.1007/s00438-011-0647-7

Yu P, Xu R, Abramson MJ, Li S and Guo Y (2020) Bushfires in Australia: a serious health emergency under climate change. *Lancet Planet Heal*. doi: 10.1016/S2542-5196(19)30267-0

Yuan L, Tang L, Zhu S, Hou J, Chen G, Liu F, Liu S and Wang C (2017) Influence of heat stress on leaf morphology and nitrogen-carbohydrate metabolisms in two wucaï (*Brassica campestris* L.) genotypes. *Acta Soc Bot Pol*. doi: 10.5586/asbp.3554

Zhang Y, Xu YH, Yi HY and Gong JM (2012) Vacuolar membrane transporters OsVIT1

and OsVIT2 modulate iron translocation between flag leaves and seeds in rice. *Plant J.* doi: 10.1111/j.1365-313X.2012.05088.x

Zhao C, Liu B, Piao S, Wang X, Lobell DB, Huang Y, Huang M, Yao Y, Bassu S, Ciais P et al. (2017) Temperature increase reduces global yields of major crops in four independent estimates. *Proc Natl Acad Sci U S A.* doi: 10.1073/pnas.1701762114

Zheng J, Yang B, Ruusunen V, Laaksonen O, Tahvonen R, Hellsten J and Kallio H (2012) Compositional differences of phenolic compounds between black currant (*Ribes nigrum* L.) cultivars and their response to latitude and weather conditions. *J Agric Food Chem.* doi: 10.1021/jf3012739

Zhu Q, Zheng X, Luo J, Gaut BS and Ge S (2007) Multilocus analysis of nucleotide variation of *Oryza sativa* and its wild relatives: Severe bottleneck during domestication of rice. *Mol Biol Evol.* doi: 10.1093/molbev/msm005

Zuberi MJS and Ali SF (2015) Greenhouse effect reduction by recovering energy from waste landfills in Pakistan. *Renew Sustain Energy Rev* 44:117–131. doi: 10.1016/j.rser.2014.12.028