

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
Programa de Pós-Graduação
em Genética e Biologia Molecular

Caracterização de plantas de arroz deficientes para genes de transporte vacuolar
OsVIT1 e *OsVIT2*

Betina Debastiani Benato

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.

Orientador: Prof. Dr. Felipe dos Santos Maraschin
Coorientadora: Profa. Dra. Marcia Maria Auxiliadora Naschenveng Pinheiro Margis

Porto Alegre, Junho de 2021

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Fisiologia Vegetal do Departamento de Botânica e no Núcleo de Genômica Funcional de Plantas, do Departamento de Genética do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). A aluna recebeu bolsa de estudos concedida pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Parte do trabalho também foi desenvolvido na Faculty of Science and Technology da Free University of Bozen-Bolzano (Bolzano, Itália), com bolsa de estudos concedida pela Organizzazione internazionale italo-latina americana (IILA).

Instituições financiadoras:

CNPq

FAPERGS.

AGRADECIMENTOS

Ao meus pais, Elizete e Claudio por todo o amor, suporte e incentivo para lutar pelos meus sonhos;

Ao meu orientador, Felipe dos Santos Maraschin, pela orientação durante esses quase cinco anos e por compartilhar comigo o amor e entusiasmo pela ciência;

À minha co-orientadora, Marcia Margis, por todo auxílio e suporte;

Ao professor Felipe Klein Ricachenevsky, por toda solicitude e amparo intelectual durante o desenvolvimento desse projeto;

Aos meus amigos, Bárbara, Bianca, Camila, Felipe, Laura, Lucas, Micaela, Monica, Nathália, Nathan, Paula e Sveva, por todos os sorrisos leves que me ajudaram a seguir em frente;

Aos colegas do Laboratório de Fisiologia Vegetal, em especial à Cássia, Jonata, Johnatan e Yohanna, por me ensinarem que ciência não se faz sozinha;

Aos professores da Libera Università di Bolzano, Tanja Mimmo e Stefano Cesco, por abrirem as portas de seus laboratórios e concordarem com os diversos experimentos propostos;

À IILA, pela concessão da bolsa que permitiu a realização de diversos experimento na Itália;

Ao CNPq, CAPES e FAPERGS pelo apoio financeiro;

E a todos que, de alguma forma, contribuíram para minha formação pessoal e científica.

Muito obrigada!

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	6
RESUMO.....	8
ABSTRACT	9
1. INTRODUÇÃO.....	10
1.1 O papel do ferro como micronutriente essencial	10
1.1.1 Importância do ferro para a saúde humana	10
1.1.2 Importância do ferro para as plantas	11
1.2 Absorção, translocação e armazenamento de Fe em plantas	12
1.2.1 Estratégias de absorção de ferro pelas plantas.....	12
1.2.2 Homeostase e translocação de ferro para órgãos drenos.....	14
1.2.3 Homeostase do ferro na parte aérea	16
1.2.4 Transporte vacuolar de ferro.....	17
1.2.5 Translocação de ferro para as sementes.....	20
1.3 Biofortificação do arroz como estratégia para reverter a deficiência nutricional	22
2. OBJETIVO	25
2.1 Objetivo geral	25
2.2 Objetivos Específicos	25
3. CAPÍTULO I	26
ABSTRACT	27
INTRODUCTION.....	28
MATERIAL AND METHODS.....	29
Generation of <i>osvit1/2</i> mutants by CRISPR/Cas9	29
Plant material and treatments	30
Gene expression analysis by RT-qPCR.....	31

Perls' Staining.....	31
Chlorophyll quantification.....	32
Ionic profiling of plant tissues.....	32
Statistical analysis.....	32
RESULTS	32
Characterization of <i>osvit1/2</i> double mutants.....	32
Phenotypic and molecular characterization of <i>osvit1/2.1</i> and <i>osvit1/2.2</i> at the vegetative stage.....	33
Ionic profiling of <i>osvit1/2.1</i> and <i>osvit1/2.2</i> in vegetative stage	35
Phenotypic analysis of <i>osvit1/2.1</i> and <i>osvit1/2.2</i> in the reproductive stage.....	37
DISCUSSION.....	40
SUPPLEMENTAL MATERIAL.....	44
REFERENCES.....	44
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	54
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56

LISTA DE ABREVIATURAS

AHA: do inglês, *H⁺-ATPase*

Al: Alumínio

B: Boro

CCC1: do inglês, *Ca²⁺-Sensitive Cross-Complementer 1*

Ca: Cálcio

Cu: Cobre

Cd: Cádmio

DHN: do inglês, *dehydrin*

DMA: do inglês, *deoxymugineic acid*

DNA: do inglês, *deoxyribonucleic acid*

DVBs: do inglês, *diffuse vascular bundles*

Fe: Ferro

FER: do inglês, *ferritin*

FRDL: do inglês, *ferric reductase defective like*

FRO: do inglês, *ferric reductase oxidase*

IDEF: do inglês, *iron-deficiency responsive element binding factor*

IRT: do inglês, *iron regulated transporter*

ITP: do inglês, *iron transport proteins*

K: Potássio

MA: do inglês, *mugineic acid*

Mn: Manganês

Mg: Magnésio

NA: do inglês, *nicotinamine*

NRAMP: do inglês, *natural resistance-associated macrophage protein*

HMW: do inglês, *high molecular weight glutenin-D1*

HMA: do inglês, *heavy metal ATPase*

NAS: do inglês, *NA synthase*

P: Fósforo

PCBs: do inglês, *parenchyma cell bridges*
pH: do inglês, *potential of hydrogen*
RNAi: do inglês, *RNA interference*
S: Enxofre
SUT: do inglês, *sucrose transporter*
TOM1: do inglês, *target of myb1*
TVBs: do inglês, *transit vascular bundles*
VBs: do inglês, *vascular bundles*
VMT: do inglês, *vacuolar mugineic acid transporter*
VIT: do inglês, *vacuolar iron transporter*
VTL: do inglês, *vacuolar iron transporter- like*
YS: do inglês, *yellow stripe*
YLS: do inglês, *yellow stripe like*
ZIFL: do inglês, *zinc-induced facilitator-like*
ZIP: do inglês, *zinc transporter*
Zn: Zinco

RESUMO

O ferro é um micronutriente essencial para saúde humana e desenvolvimento vegetal por estar envolvido em diversos processos metabólicos, como transporte de oxigênio, síntese de DNA e transporte de elétrons. No Brasil, o estado do Rio Grande do Sul é o maior produtor de arroz do país e possui caracteristicamente solos ácidos ricos em ferro. Mesmo com a alta disponibilidade de ferro para as plantas, os grãos de arroz acumulam muito pouco deste mineral. Os mecanismos envolvidos no transporte de ferro para as sementes, visando a biofortificação de grãos de arroz, ainda são pouco conhecidos. Os transportadores vacuolares de ferro *OsVIT1* e *OsVIT2* são altamente expressos em folhas bandeira, nós e camada de aleurona, regulando o transporte de ferro e zinco através do tonoplasto para o vacúolo, aprisionando os metais nesses tecidos. Mutantes perda de função para cada gene acumularam mais ferro nas sementes de arroz, tornando-os bons alvos para biofortificação. Para elucidar a participação de *OsVIT1* e *OsVIT2* na translocação de ferro, dois mutantes perda-de-função *osvit1/2.1* e *osvit1/2.2* foram gerados utilizando CRISPR/Cas9. Os mutantes *osvit1/2* não apresentaram alterações significativas no desenvolvimento vegetativo e reprodutivo, assim como nenhuma redução na produtividade de sementes foi observada em condições controle. Entretanto, a presença dos genes VIT é relevante para produção de sementes em situações de deficiência de ferro, assim como para a homeostase de Mg^{2+} e Cu^{2+} na base da parte aérea. Ambos os mutantes *osvit1/2* apresentaram maior acúmulo de ferro nos embriões de sementes, entretanto a quantificação desse aumento deve ser realizada em breve. Investigações sobre o processo de translocação de Fe das raízes e folhas bandeira para as sementes também estão em curso, visando um melhor entendimento desse processo para geração de arroz biofortificado.

ABSTRACT

Iron is an essential nutrient for human health and plant development because is involved in a wide variety of metabolic processes, including oxygen transport, DNA synthesis and electron transport. In Brazil, the state of Rio Grande do Sul is the major producer of rice in the country and have characteristically iron-rich acid soils. Even with the high iron availability to the plants, rice seeds accumulate low amounts of this mineral. The mechanisms that lead to iron transport to seeds allowing rice grain biofortification are still poorly understood. The rice vacuolar iron transporter genes *OsVIT1* and *OsVIT2* are expressed in the flag leaves, nodes and aleurone layer, regulating the transport of iron and zinc through the tonoplast to the vacuole, imprisoning those metals in these tissues. Loss-of-function mutants for each gene presented higher accumulation of iron on the seed, making them good targets for rice biofortification. To investigate the role of *OsVIT1* and *OsVIT2* on Fe translocation, we used CRISPR/Cas9 to generate two independent double knockout mutants, *osvit1/2.1* and *osvit1/2.2*. No significative alterations were observed during *osvit1/2* vegetative and reproductive developments, nether concerning seed production under control conditions. Although, VITs seem to be important for seed production under low Fe treatments, as well as for Mg^{2+} and Cu^{2+} homeostasis at the shoot basal region. Both *osvit1/2* mutants displayed higher Fe deposition on seed's embryos, although the enhancement needs to be yet quantified. Further investigations regarding the Fe translocation through the roots and flag leaves to the seeds are ongoing, aiming for a better understanding of this process to facilitate the development of biofortified rice.

1. INTRODUÇÃO

1.1 O papel do ferro como micronutriente essencial

1.1.1 Importância do ferro para a saúde humana

Há muito tempo, o ferro é reconhecido por possuir papel importante na saúde humana, e sua ausência é, conseqüentemente, associada a doenças. Entretanto, só na primeira metade do século XX que a relevância desse metal foi compreendida ao se elucidar a participação do ferro inorgânico na síntese de hemoglobina (Dowden e McNeill 1932). Desde então, sabe-se que o corpo humano não necessita de ferro apenas para síntese de proteínas carregadoras de oxigênio, como hemoglobina e mioglobina, mas também para formação de diferentes metaloproteínas, que estão envolvidas em processos como síntese de DNA, respiração, proliferação celular, produção de energia, entre outros (Camaschella 2015). Em todas as espécies a concentração de ferro é finamente regulada para evitar toxicidade, visto que o ferro é capaz de gerar espécies reativas de oxigênio. Sendo assim, o ferro está majoritariamente distribuído em complexos ligados às hemoproteínas, aos componentes heme, às ferritinas, às transferrinas e às enzimas ferro-flavinas (Abbaspour et al. 2014).

Quando a ingestão de ferro é menor que a quantidade mínima demandada pelo corpo, mantendo um balanço negativo a longo prazo, considera-se que o indivíduo está sofrendo de uma deficiência de ferro (World Health Organization 2001). Outros fatores que podem ser responsáveis por tal deficiência nutricional são perdas crônicas de sangue, defeitos patológicos na absorção de ferro ou o aumento da demanda em crianças, adolescentes e mulheres jovens ou grávidas (Camaschella 2019). A deficiência de ferro pode persistir sem progressão, ou evoluir para anemia (Camaschella 2015).

A anemia acomete quase 30% da população mundial, cerca de 2 bilhões de pessoas, já a anemia decorrente da deficiência de ferro é responsável por mais de 1,2 bilhão dos casos (Camaschella 2019). A prevalência da doença ocorre em países

subdesenvolvidos; entretanto é significativamente presente em países desenvolvidos. Estima-se que metade das mulheres grávidas no mundo sejam anêmicas, representando 52% das grávidas em países não industrializados, e 23% em países industrializados (World Health Organization 2001). Em países em desenvolvimento, a anemia resultante da deficiência de ferro é resultado da baixa ingestão do micronutriente e é frequentemente associada a hemorragias decorrentes de infestações por ancilostomíase ou esquistossomose (Camaschella 2019). Em países desenvolvidos, certos hábitos alimentares, como dietas vegetarianas ou que não incluam carne vermelha, e condições patológicas, como perda crônica de sangue ou má absorção, costumam ser as causas mais comuns (Camaschella 2015). Embora não se disponha de pesquisas populacionais de abrangência nacional, estudos apontam que a prevalência da anemia na população brasileira é alta: em média 35% das crianças menores de cinco anos e 65% das mulheres grávidas são acometidas pela doença (Berquó et al. 2008).

A anemia é uma doença crônica e frequentemente assintomática, sendo comumente não diagnosticada. Fraqueza, fadiga, dificuldades de concentração e baixa produtividade no trabalho são sintomas não específicos associados à baixa distribuição de oxigênio aos tecidos do corpo e à diminuição da atividade de enzimas dependentes de ferro (Camaschella 2015). A deficiência de ferro afeta as performances cognitivas, comportamentais e o desenvolvimento físico de crianças. Já em adolescentes e adultos interfere nas respostas imunes e na morbidade de infecções, além de alterar o uso de fontes energéticas pelos músculos, modificando a capacidade física. A prevalência da doença varia amplamente de acordo com as características do hospedeiro, como idade, gênero, fisiologia, patologia, ambiente e condições socioeconômicas (World Health Organization 2001).

1.1.2 Importância do ferro para as plantas

Por serem autotróficas, as plantas são capazes de assimilar carbono, enxofre e nitrogênio, além de convertê-los em todas as moléculas essenciais para sua sobrevivência, como aminoácidos, vitaminas, carboidratos e demais metabólitos. As plantas também são responsáveis pela absorção de minerais do solo e inserção da

maioria desses nutrientes na alimentação animal (Grusak e Dellapenna 1999). Dentre os nutrientes minerais absorvidos, o ferro se destaca por estar envolvido intimamente em diversos processos fundamentais para o desenvolvimento vegetal, devido às suas propriedades físico-químicas de oxirredução (Hohmann 2005).

O ferro é um componente essencial do metabolismo fotossintético, onde integra o fotossistema II, o complexo citocromo b6f e o fotossistema I, além da sua participação indireta na síntese de heme e clorofila (Briat et al. 2014). O Fe também é um importante cofator de enzimas chave de processos como fixação de nitrogênio, síntese de DNA (redutases ribonucleicas) e síntese de hormônios (lipoxigenases) (Briat et al. 1995; Briat e Lobréaux 1997). Foi demonstrado que o ferro é um fator limitante para a produção de biomassa em *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*), tomate (*Solanum lycopersicum*), espinafre (*Spinacia oleracea*) e arroz (*Oryza sativa*), dada a demasiada relevância desse metal para o desenvolvimento vegetal (Briat et al. 2014). Sendo assim, a quantidade de ferro presente em plantas é de 5 a 100 vezes maior do que qualquer outro metal de transição (Balk e Schaedler 2014).

1.2 Absorção, translocação e armazenamento de Fe em plantas

1.2.1 Estratégias de absorção de ferro pelas plantas

O ferro está abundantemente presente na crosta terrestre, entretanto sua disponibilidade depende das propriedades do solo, como potencial redox e pH (Morrissey e Guerinot 2009). O ferro é encontrado na natureza majoritariamente na forma de óxidos férricos insolúveis, um estado muito estável, mas indisponível para as plantas. Em solos aeróbicos, de pH elevado, o balanço químico é deslocado favorecendo a formação de complexos insolúveis de Fe^{3+} . Já em solos anaeróbios, que possuem pH ácido, o ferro é encontrado em sua forma solúvel Fe^{2+} , pronto para ser absorvido pelas plantas (Briat et al. 1995; Guerinot e Yi Ying 1994).

Visto que o ferro é encontrado em diferentes estados de oxidação no solo, as plantas desenvolveram diferentes mecanismos que as permitem absorver esse micronutriente essencial. A estratégia I de absorção é comum nas angiospermas, com

exceção da família Poaceae, e consiste na secreção de prótons, pela enzima H⁺-ATPase (AHA), acidificando a rizosfera. Com a diminuição do pH, a enzima FRO2 (*Ferric Reductase Oxidase 2*) medeia a redução de Fe³⁺ a Fe²⁺ e o transportador *IRT1* (*Iron Regulated Transporter 1*) é responsável pela absorção de Fe²⁺ pelas raízes (Morrissey e Guerinot 2009; Ishimaru et al. 2011).

As gramíneas são menos suscetíveis à deficiência de Fe quando crescidas em solos alcalinos por serem capazes de importar ferro por um mecanismo mais eficiente, denominado estratégia II (Guerinot e Yi Ying 1994). Esse mecanismo consiste na síntese e secreção de fitosideróforos, caracterizados como aminoácidos não proteicos sintetizados a partir da metionina, gerando ácido mugineico (MA) (Briat e Lobréaux 1997). Os fitosideróforos são exportados à rizosfera pelo facilitador *TOM1/OsZIFL4*, e se ligam ao Fe³⁺ através dos grupos amino e carboxila, formando um complexo solúvel. O complexo é importado pelas células radiculares através das proteínas *Yellow Stripe 1* (YS1) e *Yellow Stripe-Like Proteins* (YSL) (Kobayashi e Nishizawa 2012; Santos et al. 2017).

O arroz (*Oryza sativa*), particularmente, combina componentes de ambas as estratégias de absorção. Seu genoma apresenta 18 genes YSL, sendo o *OsYSL15* o principal responsável pelo transporte do complexo fitosideróforo-Fe para o citosol (Inoue et al. 2009a). Em condições de deficiência de ferro, a expressão desse gene é induzida em raízes e, de forma mais significativa, na parte aérea. Além de *OsYSL15* ser expresso na epiderme de raízes, também é expresso em sementes em desenvolvimento, podendo estar envolvido na translocação de ferro para o grão (Lee et al. 2009).

A quantidade de fitosideróforos secretados na rizosfera por plantas de arroz é inferior quando comparada com plantas de trigo e milho. Isso é compensado pela presença dos transportadores homólogos *OsIRT1* e *OsIRT2*, importantes para a estratégia I de absorção de ferro, sendo expressos predominantemente nas células radiculares de arroz e induzidos em deficiência de Fe (Lee e An 2009). Em mutantes sem a capacidade de síntese de fitosideróforos, a expressão desses transportadores é altamente induzida (Morrissey e Guerinot 2009). O gene *OsIRT1* possui baixos níveis de expressão na parte aérea em condições ideais, e tem sua expressão induzida quando a planta é submetida à deficiência de ferro; enquanto o aumento da

expressão do gene em raízes responde tanto a deficiência de Fe como também de Zn, Cu e Mn (Lee e An 2009).

Assim como os genes envolvidos na estratégia I, os genes associados com a estratégia II têm expressão induzida em deficiência de ferro (Ricachenevsky e Sperotto 2014). Os fatores de transcrição *IDEF1* e *IDEF2* (*Iron-deficiency responsive element binding factor*) e *IRO2* (*Iron regulated basic helix-loop-helix*) são genes chave na regulação da absorção de ferro, sendo *OsIRO2* regulado positivamente por *IDEF1* (Santos et al. 2017). A superexpressão ectópica de *OsIRO2* induziu a expressão de genes envolvidos na estratégia II de absorção de Fe, enquanto sua repressão, por RNA de interferência (RNAi), tornou as plantas suscetíveis à deficiência de ferro. Além disso, o padrão de indução da expressão de *OsIRO2*, em condições de deficiência de ferro, se assemelha ao de outros genes induzidos nessa mesma condição (Ogo et al. 2006).

1.2.2 Homeostase e translocação de ferro para órgãos dreno

Devido a sua atividade redutora, o ferro é potencialmente muito tóxico. Durante a redução do oxigênio molecular são formados superóxidos e peróxidos de hidrogênio que são catalisados por Fe^{2+} e Fe^{3+} para formarem radicais hidroxil altamente reativos (Kim e Guerinot 2007). Tais radicais podem acarretar peroxidação lipídica, oxidação proteica, mutações no DNA e conseqüentemente dano celular e possível morte celular (Hohmann 2005). Dessa forma, uma vez internalizado no simplasto, sua concentração precisa ser regulada finamente (Balk e Schaedler 2014).

Após ser transportado para o simplasto, o Fe^{2+} se liga a componentes quelantes que evitam sua toxicidade e facilitam sua solubilidade. O ferro também pode ser reoxidado e ligado a pequenas moléculas como aminoácidos, fenóis ou ácidos orgânicos (Briat et al. 1995; Santos et al. 2017). Os quelantes possuem propriedades e ambientes específicos: o citrato se liga ao Fe^{3+} no xilema cujo pH é 5,5 e a nicotinamina (NA) forma complexos estáveis tanto com Fe^{3+} como com Fe^{2+} no floema, de pH 7,5, evitando sua precipitação (Kim e Guerinot 2007; Morrissey e Guerinot 2009). O ácido deoximugineico (DMA), sintetizado a partir do ácido

mugineico (MA), além de desempenhar um importante papel na absorção de ferro como fitosideróforo, também possui função quelante no ambiente intracelular (Bashir et al. 2010a).

O transporte de ferro das raízes à parte aérea é essencial para o desenvolvimento das plantas. Durante sua absorção pelas raízes, o ferro se desloca de forma simplástica até o periciclo e é exsudado para o xilema majoritariamente no complexo Fe-citrato por *OsFRDL1* (Ferric Reductase Defective Like 1) (Yokosho et al. 2009; Bashir et al. 2010a; Kobayashi e Nishizawa 2012). Mutantes *osfrdl1* apresentam Fe precipitado no estelo de raízes e clorose nas folhas (Yokosho et al. 2009). O transporte de ferro também deve ser mediado pelo floema, visto que o fluxo do xilema, promovido pela transpiração, impossibilita a chegada de nutrientes a regiões como sementes, ápice caulinar e ápice radicular (Morrissey e Guerinot 2009). Uma vez dentro do floema, acredita-se que o transporte de Fe também seja mediado por peptídeos de transporte ITP (*Iron Transport Proteins*), que são desidrinas (DHN) que se ligam a Fe^{3+} , entretanto a presença dessas proteínas foi confirmada apenas em mamona (*Ricinus communis*) (Morrissey e Guerinot 2009; Santos et al. 2017). Em arroz, apenas a presença de DMA foi confirmada como principal quelante de Fe no floema (Grillet et al. 2014).

Para ser entregue e assimilado pelas folhas, o Fe é reduzido por enzimas FRO (*Ferric Reductase Oxidase*) e transportado como complexo Fe-NA pelo floema até os órgãos dreno (Santos et al. 2017). Em *Arabidopsis*, os genes YSL são propostos como responsáveis pelo transporte de Fe-NA para dentro e fora do floema (Morrissey e Guerinot 2009). Em células do floema de arroz, cultivado sob condições de suficiência de Fe, foi detectada a expressão do gene *OsYSL15* e a presença de *OsIRT1*, a partir de uma linhagem repórter, sugerindo a participação dos genes no transporte de ferro para o floema (Inoue et al. 2009b; Ishimaru et al. 2006). Outro gene da família YSL, *OsYSL2*, teve sua função associada ao depósito de ferro nas folhas e sementes por possuir expressão aumentada em células companheiras do floema da parte aérea, sob condições de deficiência de ferro (Morrissey e Guerinot 2009).

1.2.3 Homeostase do ferro na parte aérea

Uma vez dentro das células, o ferro pode ser incorporado a proteínas, estocado em plastídeos e mitocôndrias ou armazenado em vacúolos para evitar citotoxicidade. Essa compartimentalização é útil para a homeostase de metais, principalmente em situações de excesso desse elemento, além de suprir a demanda das organelas que desempenham processos dependentes de Fe, como respiração e fotossíntese (Couturier et al. 2013). O transporte subcelular de Fe e sua compartimentalização entre as organelas é mediado por genes da família NRAMP (*Natural Resistance-associated Macrophage Protein*). Foram encontrados seis genes dessa família em *A. thaliana* e oito em arroz (*OsNRAMP1-OsNRAMP8*). O gene *OsNRAMP1* é expresso majoritariamente em raízes, enquanto *OsNRAMP2* é expresso em folhas e *OsNRAMP3* em ambos os tecidos (Santos et al. 2017). Em *Arabidopsis*, as proteínas AtNRAMP3 e AtNRAMP4 são responsáveis pelo efluxo de ferro dos vacúolos para o citoplasma durante a germinação (Kobayashi e Nishizawa 2012).

O cloroplasto é o maior armazenador de ferro nas plantas, acumulando de 80% a 90% do ferro celular, dada a participação ativa desse metal em processos fotossintéticos (Kobayashi e Nishizawa 2012). A mitocôndria, por desempenhar processos como a respiração e a biossíntese do heme, também é um local de acúmulo de ferro (Morrissey e Guerinot 2009). Para que o ferro esteja disponível em sua forma bioativa e não cause danos às organelas, ele se encontra associado à ferritina, um complexo proteico multimérico capaz de armazenar até 4500 átomos do metal (Briat et al. 1995). Em arroz, os genes *OsFER1* e *OsFER2* codificam as proteínas que compõem tal complexo, tendo sua expressão aumentada quando as plantas são crescidas em excesso de ferro (Stein et al. 2009). Outra associação relevante que o ferro realiza é com o enxofre (Fe-S), comumente encontrado em cloroplastos e mitocôndrias, onde participa da constituição de diversas metaloproteínas essenciais para o funcionamento celular (Couturier et al. 2013).

1.2.4 Transporte vacuolar de ferro

O vacúolo regularmente atua como um reservatório de metais para evitar a toxicidade (Kobayashi e Nishizawa 2012). A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é capaz de sobreviver por gerações sem a presença de ferro exógeno, indicando a capacidade de acúmulo de ferro intracelular. A proteína CCC1 (*Ca²⁺-Sensitive Cross-Complementer 1*) é expressa no tonoplasto da levedura e é responsável pelo aporte de ferro do citosol para o vacúolo (Li et al. 2001). Uma proteína ortóloga que possui 62% de similaridade à CCC1 foi identificada em *Arabidopsis thaliana* e denominada *AtVIT1* (*Vacuolar Iron Transporter*) (Kim et al. 2006). Os genes VIT formam uma família de transportadores que compartilham altos níveis de similaridade de sequência entre espécies vegetais, fungos e protistas, como o vetor da malária *Plasmodium falciparum* (Slavic et al. 2016). Além da capacidade de transportar ferro, suas funções biológicas podem divergir, assim como sua seletividade no transporte de metais (Connorton et al. 2017). Essa família pode ser dividida em dois clados: VIT e VTL (*Vacuolar Iron Transporter- Like*), sendo a diferença entre eles a ausência, em VTL, de três hélices citoplasmáticas, cuja função proposta é a de mediar o antiporte de Fe^{2+}/H^+ (Kato et al. 2019) (Ram et al. 2021). Comparações entre 34 genes VIT oriundos de 14 espécies de plantas demonstraram que, com exceção de *Arabidopsis*, as plantas possuem mais de uma cópia desses genes, variação que possivelmente sugere efeitos evolutivos (Ram et al. 2021).

Em *Arabidopsis*, o gene *AtVIT1* possui baixa expressão em tecidos vegetativos e níveis mais elevados de expressão em sementes em desenvolvimento; além de seus níveis transcricionais não serem afetados pela disponibilidade de ferro, diferentemente de outros transportadores de ferro (Kim et al. 2006). Em embriões de *A. thaliana* foi observado que o ferro se localiza em feixes provasculares e essa distribuição é alterada em mutantes de perda de função *vit1*, sendo disposto de forma mais difusa no hipocótilo e radícula. Todavia, a quantidade total de ferro em sementes e folhas não foi alterada, apenas sua distribuição. Outros metais como Mn e Zn não apresentaram disposição alterada nos mutantes *vit1*, entretanto, a expressão de *AtVIT1* proporciona maior acúmulo de manganês em leveduras. Um gene ortólogo a *AtVIT1* foi identificado em *Tulipa gesneriana*, ao longo de estudos que objetivavam a compreensão do mecanismo que resulta na coloração azulada na base de pétalas

roxas. O gene *TgVIT1* é expresso exclusivamente no epitélio, em células que apresentam a coloração azulada, e através de experimentos de expressão transiente, foi possível determinar que a proteína se localiza no tonoplasto e a coloração característica da região é resultado do acúmulo de ferro no vacúolo (Momoni et al. 2009). Em trigo (*Triticum aestivum*), dois genes parálogos foram caracterizados, *TaVIT1* e *TaVIT2*, sendo *TaVIT2* capaz de complementar leveduras $\Delta ccc1$ quanto ao aporte de ferro para o vacúolo. *TaVIT2* também foi capaz de complementar um mutante para transporte de manganês, mas não foi capaz de complementar o transporte de zinco. Já *TaVIT1* não foi capaz de complementar linhagens de leveduras mutadas para transporte vacuolar de Fe, Zn, e Mn, indicando uma localização diferente do tonoplasto. Visando o aumento da quantidade de ferro nos grãos de trigo, o gene *TaVIT2* foi superexpresso sob controle do promotor específico de endosperma HMW (*High Molecular Weight Glutenin -D1*), resultando em um aumento de mais de duas vezes no teor de ferro na farinha branca (Connorton et al. 2017).

Em arroz, os genes *OsVIT1* e *OsVIT2* foram caracterizados como responsáveis pelo transporte vacuolar de ferro, apresentando aproximadamente 80% de similaridade de aminoácidos com a proteína *AtVIT1*. As proteínas *OsVIT1* e *OsVIT2* se localizam no tonoplasto, sendo responsáveis pelo transporte de Fe^{2+} e Zn^{2+} para o vacúolo e assim como *AtVIT1*, não são capazes de transportar Cd^{2+} . Ambos os genes são expressos nas bainhas de folhas bandeira, enquanto apenas *OsVIT1* apresenta elevada expressão nas lâminas das folhas bandeira, na fase da colheita do arroz (Zhang et al. 2012). *OsVIT1* apresenta altos níveis constitutivos de expressão, e como o observado em tulipa, não responde a diferentes concentrações externas de ferro. Durante o florescimento, possui elevados níveis transcricionais nas lâminas de folhas bandeira, e durante o enchimento dos grãos, o mesmo é detectado em bainhas de folhas bandeiras. Já *OsVIT2* possui baixa expressão constitutiva, é altamente induzido pelo excesso de ferro e está intimamente envolvido na distribuição de ferro para diferentes tecidos. Tanto durante o florescimento quanto no enchimento dos grãos é altamente expresso nas bainhas de folhas bandeira e no nó I (Zhang et al. 2012; Che et al. 2021).

Durante a fase vegetativa, *OsVIT2* é expresso em grande parte das células radiculares, com exceção das epidérmicas, sendo capazes de aprisionar o ferro localmente. Em mutantes perda-de-função *osvit2*, observou-se um decréscimo do

conteúdo de Fe nas raízes, mas não houve alteração na quantidade translocada à parte aérea, sugerindo uma pequena participação do gene nesse processo. A expressão de *OsVIT2* também foi observada no nó basal e em bainhas foliares, próximo às células do parênquima e na região do xilema, coincidindo com a região de deposição de ferro nesses tecidos (Moore et al. 2014) (Che et al. 2021). Durante o estágio vegetativo, mutantes *osvit2* apresentaram quantidades menores de Fe nas bainhas e um aumento no acúmulo em lâminas foliares, sugerindo que o Fe nesses mutantes não seja aprisionado nos vacúolos das bainhas, estando livre para ser translocado para as lâminas foliares (Che et al. 2021). Já no estágio reprodutivo, mutantes *osvit2* acumularam menos Fe no nó I e maiores quantidades nas bainhas e lâminas de folhas bandeira, quando comparadas com plantas selvagens (Che et al. 2021). Tal padrão de distribuição de Fe difere do decréscimo observado por Zhang et al. (2012) em lâminas e bainhas de folhas bandeira. Uma das razões que explicaria tal discrepância é a diferença de concentração de ferro nos meios nutritivos, sendo 20 μM no primeiro caso e 4,5 mM no segundo. Muito semelhante ao que ocorre na fase vegetativa, na fase reprodutiva a expressão de *OsVIT2* coincide com o acúmulo de ferro, nesse caso em células PCB (*Parenchyma Cell Bridges*) do nó I. Mutantes *osvit2* não apresentam deposição de Fe nessa região, resultando no transporte do metal para os DVBs (*Diffuse Vascular Bundles*) e posteriormente às sementes (Che et al. 2021).

Mutantes perda-de-função individuais para os genes *OsVIT1* e *OsVIT2* foram gerados em dois backgrounds genéticos (Zhonghua 11 e Dongjin, respectivamente) e ambos apresentaram um maior acúmulo de Fe e Zn nas sementes de arroz, especificamente no embrião, e um correspondente decréscimo nas folhas bandeira, não alterando a concentração total dos metais (Zhang et al. 2012). Esse resultado sugere que, em plantas que não possuem os genes funcionais, o ferro e o zinco não são aprisionados nos vacúolos nas bainhas de folhas bandeira, estando livres e disponíveis para serem translocados para as sementes.

1.2.5 Translocação de ferro para as sementes

Existem duas fontes de transporte de ferro e zinco para as sementes de arroz, sendo elas a mobilização a partir de outros órgãos, como folhas maduras, e a absorção direta do solo após o florescimento (Yamaji e Ma 2017). A translocação de nutrientes do xilema das raízes à parte aérea ocorre devido à pressão nas raízes e a transpiração nas folhas. Se a distribuição de nutrientes dependesse apenas da taxa de transpiração dos tecidos, os órgãos desenvolvidos, como folhas totalmente expandidas, apresentariam maior acúmulo; e órgão em desenvolvimento, como folhas novas e órgão reprodutivos, acumulariam menores quantidades devido à menor área de transpiração. Entretanto, em arroz, a concentração de Zn em meristemas é dez vezes maior do que a encontrada em folhas maduras, ilustrando a existência de um sistema que destina elementos essenciais para órgãos com diferentes demandas. Em gramíneas, esse sistema de distribuição ocorre nos nós (Yamaji e Ma 2014).

Durante o enchimento de grãos, a folha bandeira desempenha um papel primordial por ser responsável pela síntese e translocação de fotoassimilados para as sementes (Abou-khalifa et al. 2008). Em contrapartida, ela não parece ser a principal fonte de minerais para os grãos em desenvolvimento (Sperotto 2013). Visto que a mobilidade do ferro é limitada dentro das plantas (Briat et al. 2015), o aporte desse nutriente para os grãos de arroz ocorre majoritariamente através da absorção pelas raízes após o florescimento (Sperotto 2013). A remobilização de minerais a partir de outros órgãos, como folhas superiores, hastes e bainhas foliares e até mesmo folhas bandeira, também colabora com o depósito de nutrientes nos grãos, mesmo que em menor quantidade (Sperotto 2013). Essa remobilização ocorre nos nós superiores, especialmente no nó I, que se encontra no ponto mais alto da planta, e são caracterizados como as regiões que conectam as folhas bandeira às panículas (Yamaji e Ma 2014). Os nós possuem três tipos diferentes de feixes vasculares axiais (VBs, *Vascular Bundles*), sendo eles os feixes vasculares alargados (EVBs, *Enlarged Vascular Bundles*), feixes vasculares de trânsito (TVBs, *Transit Vascular Bundles*) e feixes vasculares difusos (DVBs, *Diffuse Vascular Bundles*). Os EVBs provêm de nós inferiores e são conectados às folhas ligadas ao nó, enquanto as DVBs iniciam nos nós e se estendem aos nós superiores ou à panícula. Já os TVBs são uma fase de trânsito sem alargamento extra nos nós e conectam cada nó ao superior e inferior

(Yamaji e Ma 2014). Para que os nutrientes cheguem à panícula, eles devem ser realocados dos EVBs para os DVBs, sendo primeiramente transferidos do xilema para os EVBs, cruzando de forma simplástica ou apoplástica as células do parênquima, e finalmente, serem transferidos para o xilema ou floema dos DVBs (Yamaji e Ma 2017).

Alguns transportadores envolvidos na transferência intervascular de nutrientes em arroz foram identificados, como *OsZIP3* (Sasaki et al. 2015), *OsHMA2* (Yamaji et al. 2013), *OsYSL2* (Ishimaru et al. 2010), *OsYSL9* (Senoura et al. 2017), e mais recentemente, *OsFRDL1* (Yokosho et al. 2016), responsável pela liberação do citrato que solubiliza o ferro depositado no apoplasto de células do parênquima. Outro gene com seu papel elucidado é o *OsVMT* (*Vacuolar Mugineic Acid Transporter*) (Che et al. 2019), responsável pelo sequestro vacuolar de DMA, uma vez que mutantes *osvmt* apresentam maior acúmulo de Fe e Zn nos grãos de arroz polidos devido ao maior depósito de complexos de DMA-Fe e DMA-Zn nos nós. O transportador vacuolar de ferro *OsVIT2* foi recentemente associado à translocação de Fe entre bainha e lâmina foliar, nós e grãos e entre a camada de aleurona e o endosperma. Mutantes *osvit2* apresentaram aumento na concentração de Fe em sementes polidas, sem a camada de aleurona e o embrião, efeito que pode ser atribuído à expressão de *OsVIT2* na camada de aleurona. Na ausência do transportador vacuolar, o ferro não é acumulado na camada de aleurona, sendo direcionado ao endosperma (Che et al. 2021). Os mutantes *osvit2* gerados por Che et al. (2021) não apresentaram maior acúmulo de Zn e Cd, divergindo do observado por Zhang et al. (2012), onde mutantes simples *osvit1* e *osvit2* apresentaram aumento de mais de 60% na quantidade de Cd quando cultivados em solos alagados. Contudo, devido à ausência de relatos de mutantes duplos perda-de-função para ambos os genes VIT em arroz, não é conhecido o padrão de acúmulo de metais em plantas que não possuem ambos transportadores vacuolares, sendo esse o objetivo do presente trabalho.

A presença de minerais nos grãos não depende apenas da disponibilidade e remobilização, mas também da passagem pela camada de aleurona até o endosperma (Sperotto 2013). Em sementes de arroz, o ferro se encontra majoritariamente depositado em regiões que serão removidas durante o processo de polimento do grão, como na camada de aleurona, no pericarpo e embrião, restando para consumo apenas o endosperma (Bashir et al. 2010b). Sendo assim, estratégias que visam o aumento de Fe no arroz polido devem focar não apenas na regulação de

genes transportadores de metais, mas também no direcionamento de Fe ao endosperma.

1.3 Biofortificação do arroz como estratégia para reverter a deficiência nutricional

Uma das estratégias adotadas para reverter a deficiência de ferro é a suplementação baseada na ingestão de sais de ferro, ideais por possuírem maior biodisponibilidade e menores custos. Efeitos colaterais como náusea, dores epigástricas, vômito e diarreia podem ocorrer devido a ingestão de altas concentrações de ferro, acarretando em desistência do tratamento em 30% a 70% dos casos (Abbaspour et al. 2014; Camaschella 2019). Alguns dados sugerem que o ferro não absorvido possa causar danos ao paciente devido às possíveis modificações que promove na microbiota intestinal, favorecendo a proliferação de patógenos na região (Kortman et al. 2014). Todavia, programas de suplementação aplicados com êxito obtiveram sucesso em cerca de 70% dos casos, a curto prazo (World Health Organization 2001). A Organização Mundial da Saúde recomenda, além da suplementação, uma alimentação diversificada e o consumo de alimentos ricos em ferro, como carnes, peixes, legumes e vegetais de folhas verdes (Lopez et al. 2016).

A fortificação de alimentos com ferro é considerada o método com melhor custo-benefício, por prover o micronutriente às populações com altas taxas de deficiência nutricional e apresentar uma taxa de eficiência de 93% a longo prazo (Lynch 2011; World Health Organization 2001). Alimentos fortificados possuem adição de nutrientes durante seu processo de produção, como cereais matinais com adição de micronutrientes ou alimentos processados (Lynch 2011). Contudo, esse tipo de alimentação dificilmente estará disponível para as pessoas que pertencem aos grupos de risco e possuem menor poder aquisitivo (Lynch 2011). Visando sanar o problema de acessibilidade a alimentos fortificados, a biofortificação é proposta como uma alternativa às populações que possuem dificuldade em alterar seus hábitos alimentares devido a restrições financeiras, culturais, regionais ou religiosas (Masuda et al. 2012b).

A biofortificação é o processo que aumenta a concentração de nutrientes essenciais em partes comestíveis de plantas e pode ser desenvolvida por vias genéticas ou agronômicas (Frei et al. 2016; White and Broadley 2005). O arroz é o alvo ideal para biofortificação por ser um alimento altamente consumido em países em desenvolvimento, onde os índices de deficiência nutricional de ferro são mais alarmantes (Masuda et al. 2012b). Em 2018, o arroz foi o terceiro cereal mais cultivado no mundo, tendo aproximadamente 170 milhões de hectares plantados e 780 milhões de toneladas produzidas (FAO 2018). Mesmo sendo amplamente consumidos, os grãos de arroz são pobres em ferro, tendo em vista que cerca de 80% do metal se acumula na camada de aleurona e no embrião que são removidos no processo de polimento, sendo consumido apenas o endosperma (Santos et al. 2017; Kim and Guerinot 2007).

O desenvolvimento de grãos de arroz com teor aumentado de Fe e Zn tem sido o objetivo de diversos programas de biofortificação, e as estratégias utilizadas podem ser muitas. Uma delas é focada no armazenamento de Fe e Zn no endosperma através da expressão de genes da ferritina sob controle de promotores específicos de endosperma. Através da expressão do gene da ferritina de soja (*Glycine max*), *GmFER*, sob controle do promotor específico de endosperma GLUTELIN B-1 de arroz, foram obtidas plantas transgênicas com até três vezes mais ferro nos grãos de arroz (Goto et al. 1999). Entretanto, esse parece ser o limite de acúmulo de ferro em sementes de arroz modificadas através dessa estratégia, independentemente da quantidade de proteínas FER expressas no endosperma (Qu et al. 2005). Outra estratégia amplamente explorada foca no aumento da translocação de metais através da superexpressão de genes da rota de síntese de nicotinamina (NA), tais como *OsNAS* (*NA SYNTHASE*) (Masuda et al. 2012a). NA é quelante de metais catiônicos, como Fe(II) e Zn(III), além de ser precursor de DMA, que desempenha papel primordial na estratégia II de absorção de Fe (Kawakami e Bhullar 2018). A superexpressão constitutiva do gene *OsNAS2* (*NA SYNTHASE 2*) aumentou 4.4 e 2.2 vezes os teores de Fe e Zn, respectivamente, em grãos polidos (Johnson et al. 2011). Embora os resultados obtidos sejam promissores, o acúmulo de Fe e Zn parece atingir um platô. Plantas transgênicas co-expressando *OsNAS1* e *HvNAS1* (*NA SYNTHASE* de cevada, *Hordeum vulgare*), crescidas em meio contendo 100 $\mu\text{mol/L}$ de Fe acumularam 22,6 $\mu\text{g g}^{-1}$ peso seco de Fe (4.3 vezes mais que plantas controle) e 22,6

$\mu\text{g g}^{-1}$ peso seco de Zn (2.2 vezes mais) no endosperma. Quando a concentração de ferro externa foi alterada para $300 \mu\text{mol/L}$, as plantas transgênicas não apresentaram variações nos níveis de metais no endosperma (Banakar et al. 2017).

Aumentar o influxo de ferro para o endosperma também é uma estratégia de biofortificação bastante explorada. O gene *OsYSL2* (Yellow Stripe Like 2) é expresso em células do floema e em sementes em desenvolvimento, participando da absorção e homeostase de Fe em arroz. A simples superexpressão desse gene não foi capaz de alterar a quantidade de metais nas sementes, em contrapartida, quando expresso sob controle do promotor *OsSUT1* (*Sucrose Transporter 1*), que direciona a expressão para a panícula e sementes imaturas, o acúmulo de Fe nas sementes aumentou 4,4 vezes em comparação com plantas controle (Ishimaru et al. 2010). Além dos citados, outros mecanismos relacionados à absorção, transporte, remobilização e estoque de metais podem e foram explorados, assim como a combinação de estratégias (Kawakami e Bhullar 2018). A biofortificação também pode ser alcançada através da limitação da capacidade de armazenamento de minerais nos tecidos fonte, por meio da restrição de entrada de Fe e Zn nos vacúolos. Mutantes simples perda de função para os genes transportadores vacuolares de ferro e zinco *OsVIT1* e *OsVIT2* acumularam menos ferro e zinco nas folhas bandeiras, ocasionando um aumento nos níveis de metais translocados para os grãos via floema (Zhang et al. 2012). A concentração de metais também é alterada em grãos de arroz polidos em mutantes *osvit2*, levando a um aumento de 1,7 e 1,5 vezes no teor de Fe e Zn, respectivamente, quando comparados com plantas controle (Bashir et al. 2013). Visando um maior esclarecimento do processo de translocação e acúmulo de ferro e zinco nos grãos, assim como a obtenção de plantas de arroz biofortificadas, o estudo de mutantes duplos *osvit1/osvit2* é o objetivo deste trabalho, visto que até o presente momento não há relatos na literatura de plantas sem a presença de ambos os transportadores.

2. OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

Caracterizar mutantes duplos perda de função para os genes *OsVIT1* e *OsVIT2* em arroz.

2.2 Objetivos Específicos

- Selecionar plantas com mutações perda-de-função para os genes *OsVIT1* e *OsVIT2*;
- Caracterizar fenotipicamente os mutantes *osvit1/2*;
- Caracterizar ionomicamente os mutantes *osvit1/2*;
- Caracterizar molecularmente os mutantes *osvit1/2*.

3. CAPÍTULO I

Manuscrito em preparação, será submetido à *Frontiers in Plant Science*.

OsVIT1/OsVIT2 double knockout enhances iron accumulation in rice seeds

Betina Debastiani Benato¹, Felipe Klein Ricachenevsky², Marcia Margis-Pinheiro¹,
Tanja Mimmo⁴, Stefano Cesco⁴, Felipe dos Santos Maraschin^{1,3}

Authors' Affiliation

¹PPGBM - Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil.

²PPGBCM - Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil.

³PPGBOT - Programa de Pós-Graduação em Botânica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil.

⁴Faculty of Science and Technology, Free University of Bolzano, Bolzano-Bozen, Italy.

Corresponding Author:

Felipe dos Santos Maraschin

felipe.maraschin@ufrgs.br

ABSTRACT

Rice (*Oryza sativa*) is a source of energy for more than half of the world's population. The mechanisms involved in the Fe transportation to seeds are still poorly understood. Vacuole is an important organelle for storing Fe excess in plants. The rice Vacuolar Iron Transporters OsVIT1 and OsVIT2 are expressed in the flag leaves, nodes and aleurone layer and transport Fe²⁺ and Zn²⁺ through the tonoplast to the vacuole, imprisoning those metals in these tissues. Loss-of-function mutants for each gene presented higher accumulation of iron on the seed, making them good targets for rice biofortification. We used CRISPR/Cas9 to generate two independent double knockout mutants, *osvit1/2.1* and *osvit1/2.2*. No significant alterations were observed during *osvit1/2* vegetative and reproductive developments, neither concerning seed production under control conditions, although differences were observed between their phenotypes in Fe treatments. VITs seem to be important for seed production under low Fe treatments, as well as for Mg²⁺ and Cu²⁺ homeostasis at the shoot basal region. In Fe excess treatments, OsVIT1 and OsVIT2 are responsible for detoxifying the intracellular environment and in their absence, ferritin takes the leading role. The knockout of both *OsVIT* genes led to a higher and more diffused Fe accumulation in the seeds of both mutants, especially in the embryo. Our results show that by preventing Fe vacuolar transportation and storage in plant tissues its possible to increase the iron concentration in rice seeds.

Keywords: biofortification, mineral nutrition, metal transporters, CRISPR/Cas, vacuole iron transporters, VIT, rice.

INTRODUCTION

Iron (Fe) functions as an essential cofactor in a range of cellular processes involving electron transfer and redox-dependent catalysis, thus being required for all living organisms (Curie and Briat 2003). Iron deficiency in humans is the most widespread micronutrient deficiency, affecting more than two billion people worldwide (Graham et al. 2012). Its highest prevalence occurs in the African continent and South Asia, being a special health problem for people subsisting on cereal-based diets, such as rice (*Oryza sativa*) (Von Grebmer et al. 2014). A variety of biofortification approaches have been developed to enhance the nutritional content in this crop, given the fact that rice is a staple crop for half the world's population. Unfortunately, most of rices' iron content is located in the embryo and aleurone layer, which are lost during milling (Santos et al., 2017; Huang et al., 2020).

There are several steps involved in Fe translocation from the soil into the seeds, such as uptake, root-to-shoot translocation, storage and distribution. After uptake, Fe concentrations must be tightly regulated to avoid precipitation and cellular damage by the formation of reactive oxygen species (Connolly and Guerinot, 2002; Kim and Guerinot, 2007). Iron chelators such as nicotianamine (NA), citrate, and deoxymugineic acid (DMA) play important roles allowing safe metal translocation throughout the plant (Von Wirén et al., 1999; Durrett et al., 2007; Inoue et al., 2009; Bashir et al., 2010). Once inside the cells, iron can be stored in a bioavailable and non-toxic form in the ferritin complex (Liu et al. 2003). In rice, *OsFER1* and *OsFER2* encode the proteins that make up the ferritin complex, showing higher expression when plants are grown under iron excess (Stein et al. 2009). Although enhancing ferritin expression have been the focus of many biofortification strategies, the Fe concentrations do not increase with ferritin levels (Goto et al., 1999; Qu et al., 2005), suggesting that Fe accumulation may be limited by the uptake and transport of this element.

Vacuolar sequestration is another important mechanism regulating Fe homeostasis, acting as a storage pool to avoid toxicity (Kobayashi and Nishizawa 2012). In *Arabidopsis*, Vacuolar Iron Transporter 1 (*AtVIT1*) was identified as Fe²⁺ and Mn²⁺ transporter from the cytoplasm to the vacuole and associated with metal spatial distribution in developing embryos (Kim et al. 2006). Since the discovery of *AtVIT1*, VIT transporters have been identified in other species showing slightly different

biological functions and metal transport specificity, like *TgVIT1* from *Tulipa gesneriana* (Momonoi et al. 2009), *CcVIT* from *Centaurea cyanus* (Yoshida and Negishi 2013) and *TaVIT1* and *TaVIT2* from *Triticum aestivum* (Connorton et al. 2017). In rice, *OsVIT1* and *OsVIT2* transport Fe^{2+} and Zn^{2+} into the vacuole and show different expression patterns throughout the plant in response to iron. Both genes are expressed in flag leaf sheaths under normal conditions, along with *OsVIT1* being also highly expressed in flag leaf blades. Single loss-of-function *osvit1* and *osvit2* mutants accumulated more Fe in the grains, specifically in the embryo, and showed a corresponding decrease in its content at flag leaves, without altering the total metal concentration (Zhang et al. 2012).

Whereas uptake after flowering and translocation from other organs are the two sources of mineral elements in grains, rice nodes have been demonstrated to play a crucial role in metals distribution (Yamaji and Ma 2017). Recently, *OsVIT2* expression was detected in the nodes' parenchyma cell bridge, mestome sheath of leaf sheath and in the seed aleurone layer, agreeing with Fe deposition sites. *OsVIT2* knockout mutants showed increased iron accumulation in polished grains, suggesting that, without vacuolar sequestration, Fe is free to be translocated to other tissues. Therefore, *OsVIT2* is associated with the distribution of Fe between leaf blade and sheath, nodes and grains, and aleurone layer and endosperm (Che et al. 2021). Since there is no report of double knockout mutants *osvit1/osvit2*, we used CRISPR/Cas9 to generate double mutants to better understand Fe remobilization in rice plants.

MATERIAL AND METHODS

Generation of *osvit1/2* mutants by CRISPR/Cas9

An expression cassette (*HindIII/XhoI* fragment) containing the sgRNA scaffold and the SpCas9 coding region from *pRGE30* (Xie and Yang 2013) was subcloned into *HindIII/SalI* sites of the binary vector *pH7WG2* (Karimi et al. 2002). The resulting plasmid was named *pH7WG2-Cas9U3pgRNA*. We aimed to design a single sgRNA targeting both *OsVIT1* and *OsVIT2*. Genomic gene sequences of *OsVIT1* (LOC_Os04g38940) and *OsVIT2* (LOC_Os09g23300) were aligned in ClustalW and

regions with high homology were selected for sgRNA design using CRISPOR (<http://crispor.tefor.net/>). The target site CCATCTCCATGGGCCTCGGAGGG was selected for being directed to the end of the first exon in both genes. Double-stranded 5'- phosphorylated oligos (Table 1) were ligated into *pH7WG2-Cas9U3pgRNA* (linearized by *BsaI*). The resulting construct was transformed into rice calli (cv. Nipponbare) by *Agrobacterium*-mediated transformation (Ozawa 2009).

Regenerated T2 plants were genotyped by PCR amplicon sequencing. Genomic DNA was extracted (Doyle and Doyle 1987) from leaves of 10 transformation events and PCR amplifications were carried out using oligos OsVIT1 and OsVIT2 (Table 1). PCR products, about 230 and 150 bp, respectively, were sequenced and analyzed using TIDE (Tracking of Indels by Decomposition, Brinkman et al., 2014). Two double *osvit1/osvit2* mutants were named *osvit1/2.1* *osvit1/2.2* and selected to carry on the phenotypic and ionic analysis, as shown in Figure 1.

Plant material and treatments

Seeds of *Oryza sativa* L. (Nipponbare cv.) were submitted to 50 °C for five days for dormancy break. For germination, seeds were placed in Petri dishes with filter paper soaked in distilled water at 28 °C for five days and a photoperiod of 16h/8h light/dark. After germination, plants were transferred to soil and cultivated until maturity under flooded conditions or to plastic pots with hydroponic nutrient solution containing: 700 µM K₂SO₄, 100 µM KCl, 100 µM KH₂PO₄, 2 mM Ca(NO₃)₂, 500 µM MgSO₄, 10 µM H₃BO₃, 0.5 µM MnSO₄, 0.5 µM ZnSO₄, 0.2 µM CuSO₄, 0.01 µM (NH₄)₆Mo₇O₂₄, and 100 µM Fe⁺³-EDTA, pH adjusted to 5.4 without aeration. Plants were grown at 28 °C ± 1 °C under photoperiod of 14h/10h light/dark (30000 lux, white light). The nutrient solution was replaced twice a week. For the experiments carried out for ionic profiling, plants were grown in hydroponic nutrient solution under a photoperiod of 11h/13h light/dark (24000 lux, LED) in Bolzano, Italy.

For sampling of the vegetative stage tissues for ionic profiling, seedlings were grown in complete hydroponic nutrient solution for 21 days and then transferred to the following treatments: Nutrient solution control (containing 100 µM Fe⁺³-EDTA), Fe deficiency treatment (no iron added) or Fe excess (containing 1 mM Fe⁺³-EDTA).

Roots and shoots were collected after 21 days of treatment. For sampling during reproductive stages, plants were cultivated in the complete nutrient solution until anthesis and then transferred to the same conditions as mentioned above, until seed maturity.

Gene expression analysis by RT-qPCR

Total RNA was extracted from the third youngest leaf (n= 3) with Concert Plant RNA Reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions and quantified by spectrophotometry. Total RNA was treated with DNase I (Invitrogen), and first-strand cDNA synthesis was performed with Oligo-dT and reverse transcriptase M-MLV (Invitrogen) using 1 µg of DNase-treated RNA. RT-qPCRs were carried out in a StepOne Real-Time Cycler (Applied Biosystems). Primers used were as in Table 1. Reaction's settings were composed of an initial denaturation step of 5 min at 94 °C, followed by 40 cycles of 10 s at 94 °C, 15 s at 60 °C, 15 s at 72 °C and 40 s at 60 °C (fluorescence data collection). Samples were held for 2min at 40 °C for annealing of the amplified products and then heated from 55° to 99° C with a ramp of 0.1° C/s to produce the denaturation curve of the amplified products. RT-qPCRs were carried out in 20 µL final volume composed of 10 µL of cDNA sample diluted 100 times, 2 µL of 10×PCR buffer, 1.2 µL of 50 mM MgCl₂, 0.1 µL of 10 mM dNTPs, 0.4µL of each primer pair (10µM), 3.85µL of water, 2 µL of SYBR green and 0.05 µL of Platinum Taq DNA Polymerase (5U/µL, Invitrogen). GAPDH was used as an internal standard, and relative expression was calculated by the ddCt method (Livak and Schmittgen 2008).

Perls' Staining

Rice seeds from soil-grown plants were stained with 4% (v/v) HCl and 4% (w/v) potassium ferrocyanide solution, as described (Zhang et al. 2012), freshly made prior to use. The seeds were incubated in the staining solution and vacuum-infiltrated for approximately 45 minutes and longitudinally cut in two halves with a sharp razor blade. Imaging was performed in the stereomicroscope Leica M165 FC, with LAS software.

Chlorophyll quantification

Samples from the fully expanded uppermost leaf were collected (n=4), frozen in liquid nitrogen and stored at -80° C. Chlorophyll extraction was performed as described (Schlindwein et al. 2006) and quantified by measuring absorbances at 537, 647 and 663 nm.

Ionic profiling of plant tissues

Plants grown in hydroponics for 13 weeks were sampled for roots, shoot basal region (2 cm above the root-to-shoot junction, including basal nodes and leaf sheaths), leaf 3 sheath, leaf 3 blade, leaf 2 sheath and leaf 2 blade. Oven-dried samples (60 °C) were ball-milled (model MM400; Retsch, Haan; Germany) to gain a homogenous powder. Approximately 150 mg of each sample was acid digested with concentrated ultrapure HNO₃ (650 ml L⁻¹; Carlo Erba, Milano, Italy) using a single reaction chamber (SRC) microwave digestion system (UltraWAVE, Milestone, Shelton, CT, USA). Macro- and micronutrient concentrations were then determined by ICP-OES (SpectroARCOS, Spectro, Germany).

Statistical analysis

Mean values were compared by the Student's t test and Two-way ANOVA (p≤0.05), using the GraphPad Prism 8 (GraphPad Software) for Windows.

RESULTS

Characterization of *osvit1/2* double mutants

CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis was used to generate independent double knockout mutants *osvit1/2.1* and *osvit1/2.2*. At the *OsVIT1* locus, *osvit1/2.2* showed a heterozygous deletion of 2 and 10 bp, whereas a homozygous insertion of a T is observed in *osvit1/2.1* and both mutants have 1 bp insertion at

OsVIT2 locus, being a T in *osvit1/2.1* and an A in *osvit1/2.2*, also in homozygotes. The mutations resulted in frameshift and premature stop codons that disrupt the open reading frame of *OsVIT1* and *OsVIT2* proteins (Figure 1) confirming that both lines are double knockouts for the two genes.

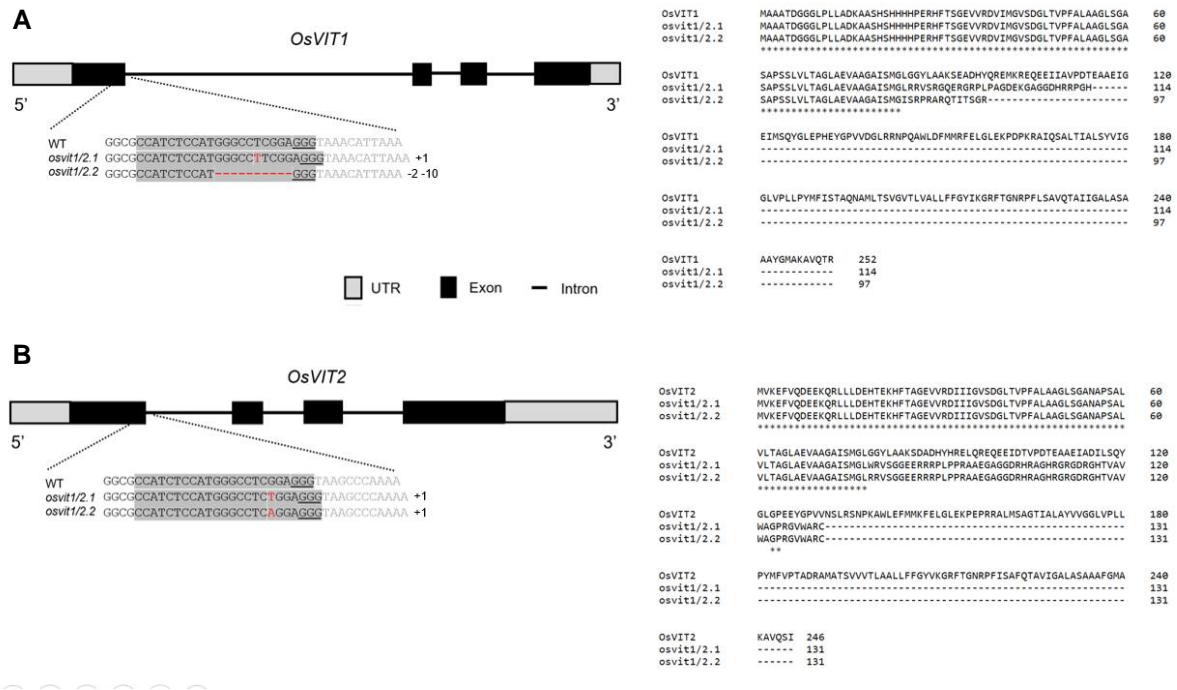


FIGURE 1. CRISPR/Cas9 induced mutations in *OsVIT1* and *OsVIT2* genes.

Schematic diagram of *OsVIT1* and *OsVIT2* (a) gene structure and the CRISPR/Cas9 target site. The PAM site is underlined and indels are marked in red color. (b) Amino acid sequence alignment of *OsVIT1* and *OsVIT2* between the wild type (WT) and the resulting mutant proteins.

Phenotypic and molecular characterization of *osvit1/2.1* and *osvit1/2.2* at the vegetative stage

To better understand the impact of *OsVIT1* and *OsVIT2* knockout in rice plants, mutants were transferred to high and low Fe solutions and their development was compared with WT plants. While no difference in shoot length was observed between the mutants and WT plants grown in control conditions (Fig 2A), both mutants displayed a decrease of the shoot length in high Fe conditions. In the absence of iron, only the *osvit1/2.1* mutant displayed shorter shoot and root lengths compared to WT plants (Fig 2A and B).

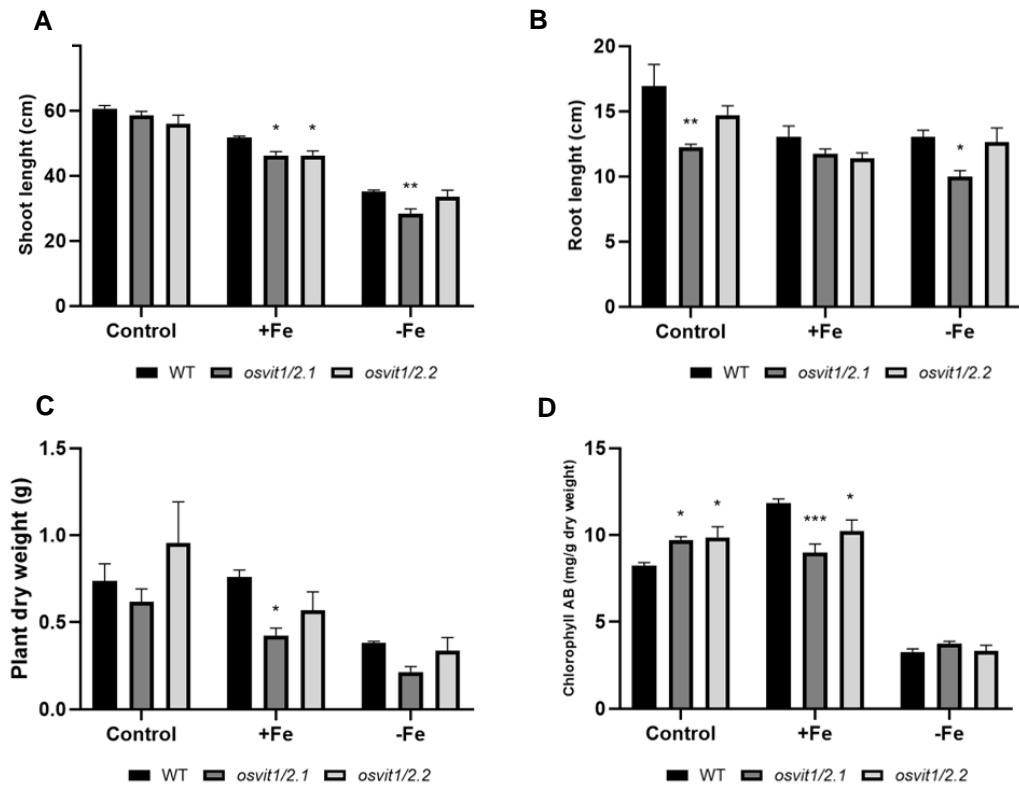


FIGURE 2. *osvit1/2.1* and *osvit1/2.2* phenotypic characterization at vegetative stage.

Rice T2 plants were grown in hydroponics complete solution for 21 days and transferred to Control (100 μM Fe^{+3} –EDTA), +Fe (1 mM Fe^{+3} –EDTA) or –Fe (no iron added) solutions. Shoots (a) and roots (b) length, plant dry weight (c) and chlorophyll AB concentration were measured after 21 days of treatment. Bars indicate means \pm SEM of 3 to 5 biological replicates (two-way ANOVA with Tukey's post-hoc test, $p < 0.05$). Asterisks above the bars indicate significant differences (* $P < 0.05$, ** $P < 0.005$ and *** $P \leq 0.0001$) compared with the WT rice.

No consistent difference was observed in dry weight since only *osvit1/2.1* displayed lower weight under Fe excess (Fig 2C). The knockout of VIT1/2 proteins seems to enhance the chlorophyll A and B levels at the vegetative stage of rice development (Fig 2D), although the opposite is observed in the Fe excess treatment. In the low Fe treatment, the chlorophyll levels for both mutants and WT plants dropped around 3-fold the amount observed in the other conditions, even though no difference was observed between genotypes Fig 2D).

Analysis of gene expression revealed that the mutations led to a downregulation of *OsVIT1* transcript levels in both *osvit1/2.1* and *osvit1/2.2*, regardless of the iron

treatment (Fig 3A). Under complete nutrient solution and Fe excess treatment, the mutants displayed a 10-fold decrease in *OsVIT1* expression and in the absence of iron a reduction of 5-fold. *OsVIT2* expression levels were not detected neither in the *osvit1/2* mutants nor WT plants, thus the data is not shown. In contrast, ferritin genes, *OsFER1* and *OsFER2*, are upregulated in both mutants under Fe excess (Fig 3B), displaying an increase of 3.5-fold in *osvit1/2.1* and 5-fold in *osvit1/2.2*. No difference in the *OsFER* expression levels was observed in the other treatments. The transcriptional factor *OsIRO2*, showed the same expression pattern between WT and mutant plants in all treatments (Fig 3C).

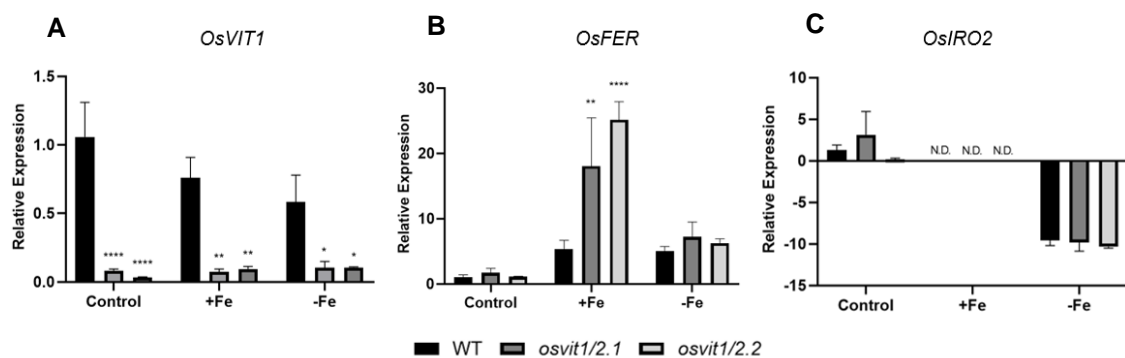


FIGURE 3. Expression of genes involved in Fe storage and uptake during vegetative development.

Relative expression of *OsVIT1* (a), *OsFER* (b) and *OsIRO2* (c) at the third leaf of 6-weeks plants was measured 21 days after transfer to Control (100 μM Fe^{+3} -EDTA), +Fe (1 mM Fe^{+3} -EDTA) or -Fe (no iron added) solutions. GAPDH was used as internal standard and N.D. indicates non detected expression. Bars indicate means \pm SEM of 3 biological replicates (two-way ANOVA with Tukey's post-hoc test, $p < 0.05$) compared with the WT plants. Asterisks above the bars indicate significant differences (* $P < 0.05$, ** $P < 0.005$ and **** $P \leq 0.0001$) compared with the WT rice.

Ionic profiling of *osvit1/2.1* and *osvit1/2.2* in vegetative stage

To help elucidate the roles of *OsVIT1* and *OsVIT2* on Fe and Zn translocation in rice plants during the vegetative stage, we grew WT and *osvit1/2* mutants in hydroponic complete nutrient solution for 13 weeks and measured the metal content in different organs (Fig 4 and 5).

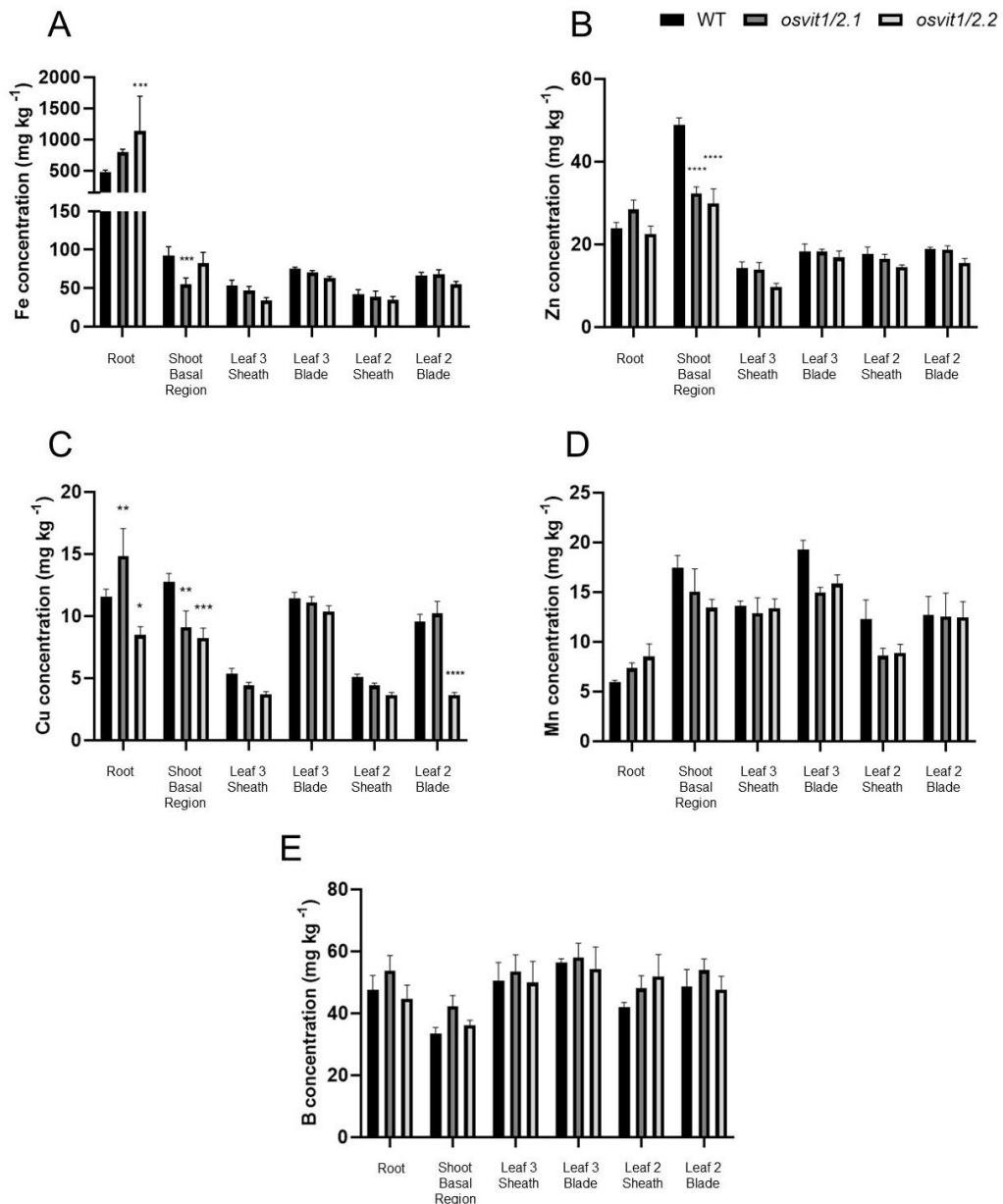


FIGURE 4. Micronutrients' concentration in different organs at the vegetative growth stage of rice.

Wild type plants (WT) and both *osvit1/2* mutants were grown in complete nutrient solution for 13 weeks when different organs were sampled and subjected to determination of Fe (a), Zn (b), Cu (c), Mn (d) and B (e) by ICP-OES. Bars indicate means \pm SEM of four biological replicates (two-way ANOVA with Tukey's post-hoc test, $p < 0.05$) compared with the WT plants. Asterisks above the bars indicate significant differences (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.006$ and **** $P < 0.0001$) compared with the WT rice.

Both mutants displayed similar patterns of Fe accumulation as the WT plants, except for the reduction on the concentration at the shoot basal region of *osvit1/2.1* mutant and the increase at the roots of *osvit1/2.2* (Fig 4A). The shoot basal region of the mutants also presents lower zinc (Zn) and copper (Cu) concentrations (Fig 4B and

C), together with lower deposition of Cu in the roots and leaf 2 blade of *osvit1/2.2*. In contrast with *osvit1/2.2*, *osvit1/2.1* displays a higher Cu concentration in the roots and no difference in other organs when compared with WT plants (Fig 4C). Despite the differences observed, only the Zn and Cu reduction in the shoot basal region was consistent among the mutants. The absence of OsVIT1 and OsVIT2 does not seem to change the manganese (Mn) and boron (B) distribution in rice plants, since no difference was observed between mutants and WT plants (Fig 4D and E). No major and consistent differences were observed regarding the phosphorus (P), potassium (K), sulfur (S), calcium (Ca) and aluminum (Al) concentrations when comparing the *osvit1/2* mutants with WT plants (Fig 5). Meanwhile, magnesium (Mg) levels in the shoot basal region, leaf 3 sheath and leaves 2 and 3 blades were considerably lower in both mutants (Fig 5C).

Phenotypic analysis of *osvit1/2.1* and *osvit1/2.2* in the reproductive stage

To investigate the role of *OsVIT1* and *OsVIT2* in the reproductive stage, we evaluated plants exposed to different Fe treatments after anthesis (Fig 6). Both mutants displayed shorter culms regardless of the treatments in which they were grown (Fig 6E). Even though *osvit1/2.2* have shorter culms than WT plants (Fig 6E), its dry weight is considerably higher in all treatments (Fig 6F), especially in the control solution when the mutant reaches twice the weight of WT plants. Meanwhile, *osvit1/2.1* displays the same dry weight as WT plants, only diverging under iron excess condition, when it accumulates less biomass. No significant difference was observed regarding seed size of mutants under Fe excess and complete nutrient solution, although both mutants displayed significantly smaller seeds under Fe deficiency (Fig 6G). The smaller size and dry weight of the *osvit1/2.1* mutant resulted in a reduction of the seed yield in high Fe conditions (Fig 6I), mainly due to the fact that most seeds were empty (Fig 6H). Meanwhile, *osvit1/2.2* displayed a similar rate of full seeds production when compared to WT plants (Fig 6H). Flag leaves of the plants grown under different iron concentrations displayed variable levels of chlorosis (Fig 6D). The *osvit1/2.1* mutant exhibits browning tips in all conditions, though the pattern is more evident under the Fe excess treatment. When the plants were grown without iron, *osvit1/2.2* displays healthier and greener leaves, when compared to WT.

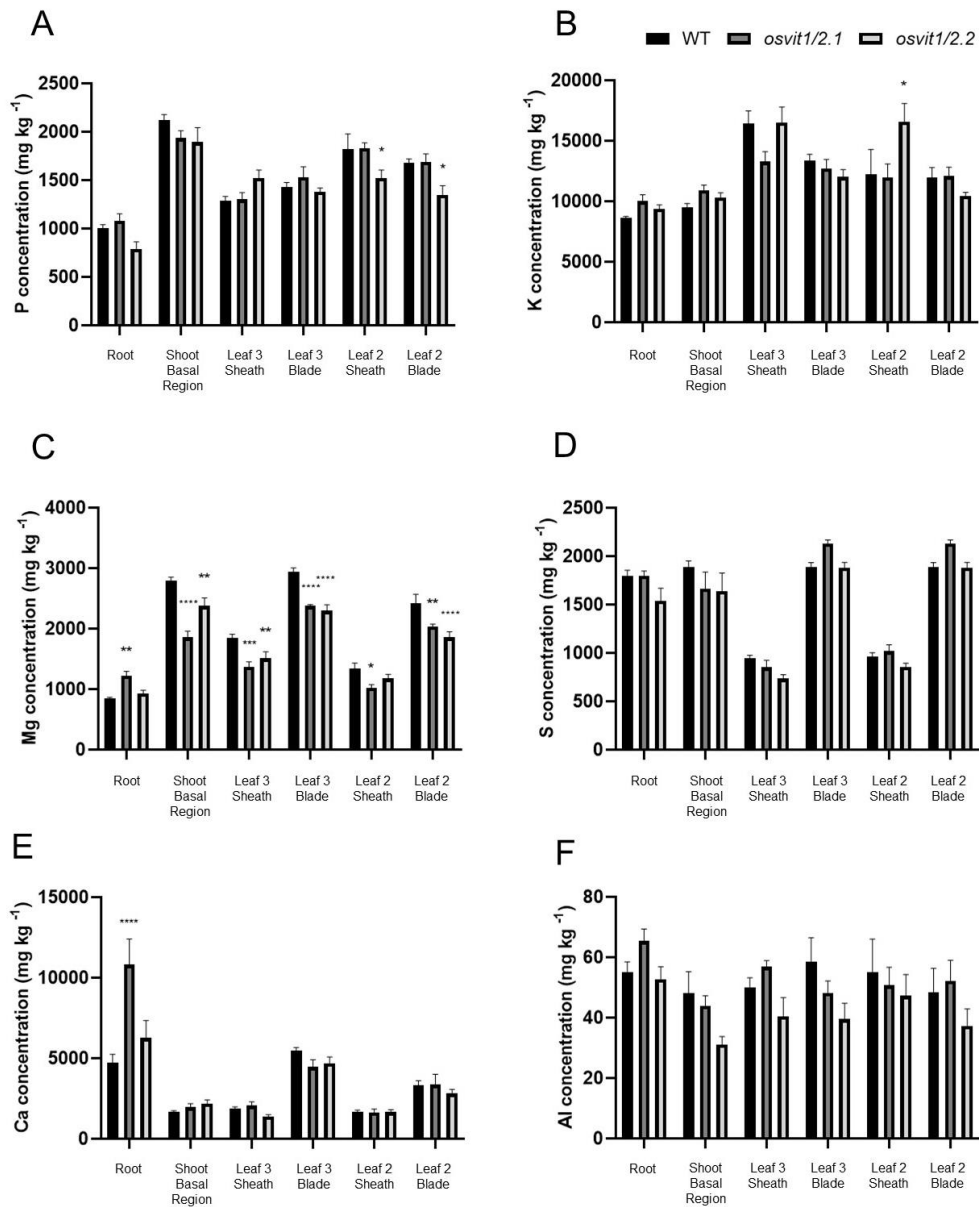


FIGURE 5. Concentration of metals in different organs at the vegetative growth stage of rice.

ICP-OES quantification of P (a), K (b), Mg (c), S (d), Ca (e) and Al (f) of wild type plants (WT), *osvit1/2.1* and *osvit1/2.2* mutants grown in hydroponics for 13 weeks. Bars indicate means \pm SEM of three to five biological replicates (two-way ANOVA with Tukey's post-hoc test, $p < 0.05$) compared with the WT plants. Asterisks above the bars indicate significant differences. Asterisks above the bars indicate significant differences (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.006$ and **** $P < 0.0001$) compared with the WT rice.

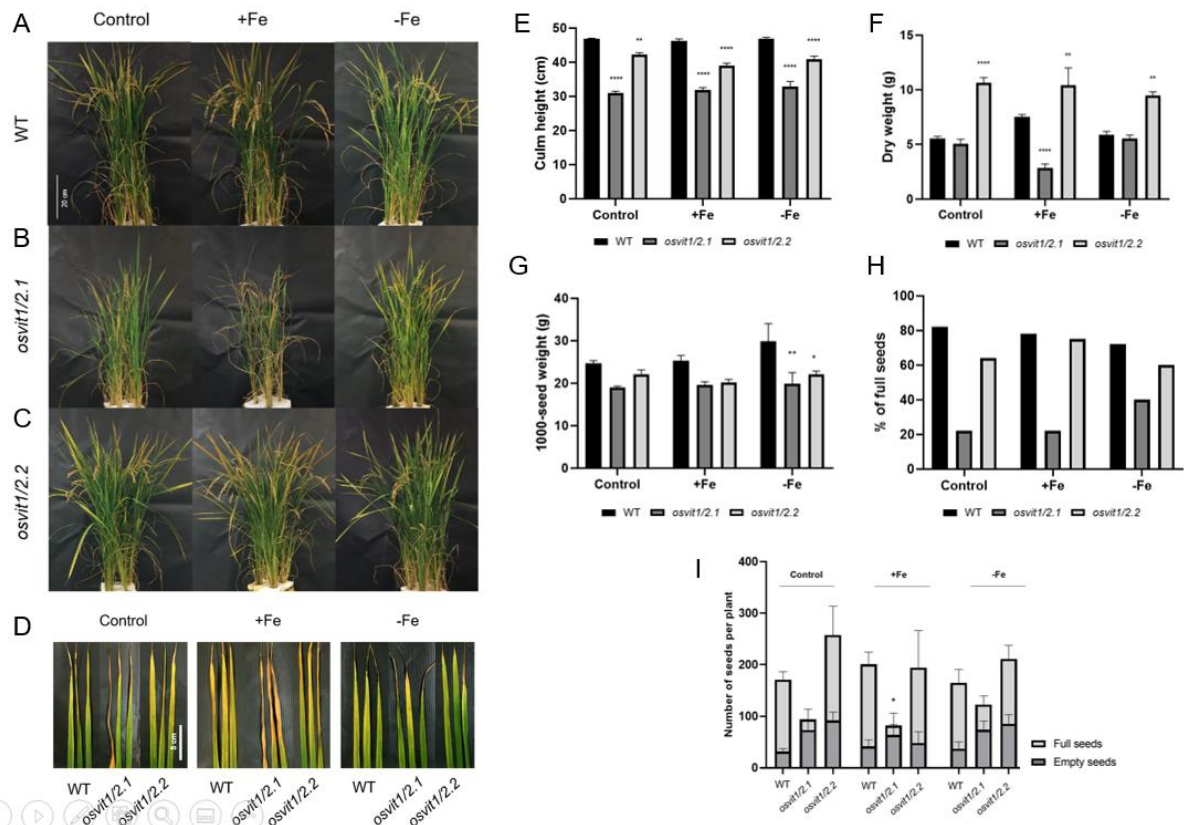


FIGURE 6. Phenotypic characterization of *osvit1/2.1* and *osvit1/2.2* mutants at the reproductive stage.

Plant growth under control (a), +Fe (b) and -Fe (c) hydroponic solutions of WT, *osvit1/2.1* and *osvit1/2.2* until seed maturity and their flag leaves (d). Culm length (e), dry weight (f), 100-seed weight (g), percentage of full seeds (h) and number of seeds per plant (i) (n=3-5). Bars indicate means \pm SEM (two-way ANOVA with Tukey's post-hoc test, $p < 0.05$). Asterisks above the bars indicate significant differences (* $P < 0.01$, ** $P < 0.009$, *** $P < 0.0005$, **** $P < 0.0001$) compared with the WT rice.

Iron deposition in seeds from soil grown plants was qualitatively measured by Perls' staining. Both *osvit1/2* mutants showed higher Fe deposition in the embryos than WT seeds (Fig 7). Both mutants show stronger and widespread staining through the embryo (Fig 7B and C), while WT seeds it is mainly localized in the scutellum (Fig 7A). These results indicate that the simultaneous knockout of VIT1 and VIT2 increases the iron accumulation in rice seeds.

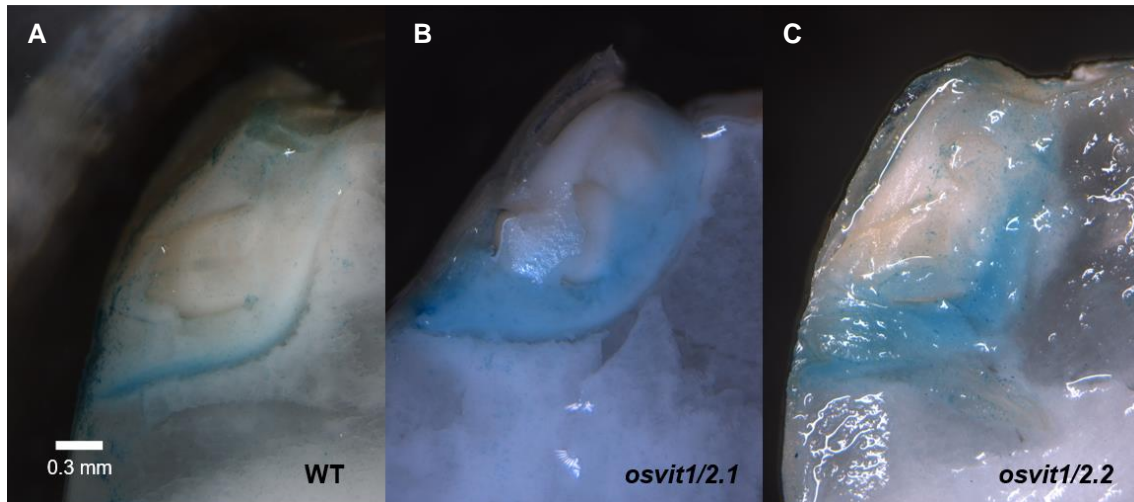


FIGURE 7. Iron deposition in rice seeds. Perls' staining images of seeds from soil grown plants indicating Fe distribution in WT (a), *osvit1/2.1* (b) and *osvit1/2.2* (c) embryos.

DISCUSSION

The role of Vacuolar Iron transporters (VIT) in plants have been elucidated in different species (Kim et al., 2006; Momonoi et al., 2009; Zhang et al., 2012; Yoshida and Negishi, 2013; Connorton et al., 2017; Che et al., 2021), enlightening the different biological functions of vacuolar storage of metals throughout the plant tissues. In rice, *OsVIT1* is constitutively expressed, mainly in flag leaf blades and sheaths and its expression is upregulated under Fe deficiency (Zhang et al. 2012). Meanwhile, when Fe levels are high, *OsVIT2* is induced in roots, shoot basal region and, more extremely, in node I (Che et al. 2021), demonstrating the complementary roles of both genes in rice metal homeostasis.

Even though the effects of the absence of each VIT gene in rice are known, there were only assumptions regarding the outcome of a double knockout mutant. Therefore, we designed a sgRNA targeting a shared region of *OsVIT1* and *OsVIT2* to obtain a double knockout mutant using CRISPR/Cas9 to better understand the translocation of metals in rice plants. The targeted mutation disrupted the reading frame of both genes (Fig 1A and B) and was able to diminish the expression levels of *OsVIT1* in both mutants 10-fold (Fig 3A). Since indel mutations should not affect the gene's transcriptional levels, the downregulation of *OsVIT1* could be the result of a positive feedback loop of VIT genes on the regulation of their own expression levels.

Once the proteins are nonfunctional, the VIT expression levels drop since the gene expression is not being enhanced. This could also be a nonsense mediated decay, triggered by mRNA surveillance machinery, downregulating the mutated genes and possibly upregulating the expression of genes that share a sequence with *OsVIT1* and *OsVIT2* (El-Brolosy et al. 2019). Analyses of the other VIT gene expression in *osvit* single mutants could lead to a clearer vision of how these genes are being regulated, however this was not measured in previous works (Zhang et al., 2012; Che et al., 2021).

The double-knockout of *OsVIT* genes does not affect the shoot height when plants are grown in complete nutrient solution (Fig 2A), although it increases the chlorophyll levels (Fig 2D). The absence of vacuolar transport could increase the cytoplasmatic Fe levels and consequently the chlorophyll synthesis, since it is known that Fe is essential for the structure and function of the photosynthetic electron transfer chain (Briat et al. 2015). Meanwhile, the mutation seems to reduce the shoot length when plants are exposed to Fe excess conditions (Fig 2A). This difference was not observed in the single *osvit* mutants described by Zhang et al., 2012 and Che et al., 2021, although they analyzed 15-days seedlings and we measured 6-weeks-old plants. The Fe concentration used in the excess treatments was also different, while Zhang et al., 2012 used 4.5 mM and Che et al., 2021 used 2 and 20 μM of FeSO_4 , we used 1 mM of Fe^{+3} -EDTA. The impact of exposing *osvit1/2* mutants to high Fe concentrations could lead to an enhancement of its intracellular levels, due to the compromised vacuolar storage route. This Fe excess can lead to toxicity and the decrease of shoot and root biomass as well as plant height (Fageria and Rabelo 1987). In agreement with the phenotype displayed by rice plants under iron excess, both *osvit1/2* mutants have reduced shoot length (Fig 2A) and chlorophyll content (Fig 2D), as well as higher induction of ferritin genes (Fig 3B) in an attempt to chelate the free intracellular Fe.

Moreover, *osvit1/2.1* and *osvit1/2.2* displayed different shoot and root length under low Fe treatment (Fig 2A and B), as well as contrasting root length in control conditions (Fig 2B). Plants dry weight made the phenotypic contrast between the mutants clearer, since *osvit1/2.2* produces more biomass in all treatments, meanwhile *osvit1/2.1* only diverges from WT plant under iron excess, when it shows a weight decrease (Fig 2C). These disagreements between mutants' phenotypes could be the

result of somaclonal variations that happened during the generation of the mutants or the effect of CRISPR's off-target mutations (Hahn and Nekrasov, 2019; Li et al., 2019). Since further investigations need to be performed to better understand the discrepancy between the two phenotypes, we will focus the discussion on the similarities that the mutants share that are distinct from WT plants.

Ionic profiling of *osvit1/2* mutants showed that the absence of vacuolar transporter does not affect the Fe levels in any tissue measured during the vegetative development (Fig 4A). Meanwhile, 15-days-old *osvit2* mutants displayed lower levels of iron in the shoot basal region and increased levels in leaves 5 and 6 blade and sheaths, probably as a result of Fe translocation since it is not trapped in the basal shoot tissue (Che et al. 2021). The absence of both VIT genes could trigger a secondary pathway to maintain the Fe levels in all vegetative tissues, meanwhile this does not happen with single *osvit* mutants possibly due to homolog redundancy.

The double knockout of OsVIT1/OsVIT2 does not seem to affect the differential accumulation of Mn, B, P, K, S, Ca and Al in rice vegetative tissues (Fig 4 and 5). However, a decrease in the Zn (Fig 4B) and Cu (Fig 4C) concentrations in the shoot basal region was observed in the *osvit1/2* mutants with no increase in the concentration of metals in other organs. This region is an Fe and Zn deposition site (Che et al., 2021; Mu et al., 2021) and the decrease in zinc concentration in OsVIT1/OsVIT2 knockout mutants indicates the possible role of VIT genes in its storage in the shoot basal region. Meanwhile, Cu accumulation pattern in this region is not clear, however, as a bivalent cation, its transport could be mediated by VIT proteins. A consistent reduction in Mg levels in the shoot basal region, leaves 2 and 3 blades and leaf 3 sheath is also observed in both mutants (Fig 5C), indicating that OsVIT1 and OsVIT2 might also play a role in Mg homeostasis. Since *OsVIT* genes never had their Mg²⁺ transport activity measured, it is plausible that they could transport another bivalent cation, as the Magnesium/Proton Exchanger 1 of *A. thaliana* (*AtMHX1*), that encodes a vacuolar transporter capable of exchanging protons with Mg²⁺, Zn²⁺ and Fe²⁺ (Hermans et al. 2013).

At the reproductive stage, OsVIT proteins might play an important role in detoxifying the subcellular Fe excess, since *osvit1/2* flag leaves display more severe bronzing symptoms under control and Fe excess treatment than WT plants (Fig 6D).

Since Fe toxicity disrupts photosystem II and elevates the cytochrome b6/f content of thylakoid, the photosynthetic rate is lowered and the oxygen production is accelerated, leading to irreversible cellular damage and leaf bronzing, as a result of cell death (Aung and Masuda 2020). When no Fe was added to the nutrient solution, *osvit1/2* mutants recovered the WT phenotype (Fig 6D) suggesting that the intracellular Fe level was not toxic in these conditions. VIT proteins might also have a role in plant development, since the *osvit1/2* mutants display shorter culms (Fig 6E), although *osvit1/2.2* plants approximately doubled the biomass in all treatments (Fig 6F). The same increase in the dry weight is not shared with *osvit1/2.1* mutant probably due to somaclonal variation or second-site mutations. Under Fe deprivation, the presence of VIT proteins seems to be crucial to maintain a healthy seed development (Fig 6G). Although no significant differences were observed regarding seeds yield nor the number of empty seeds (Fig 6I), 80% of *osvit1/2.1* seeds under control and Fe excess treatment are empty (Fig 6H). Also, a delay on *osvit1/2.1* flowering was observed during our experiments, however this was not precisely measured, and the data is not shown. However, the rate of full seeds produced by *osvit1/2.2* is higher than 60% in all treatments, similar to WT rate's production (Fig 6H). In the future, we plan to analyze more edited events to average out the discrepancies observed in the genotypes presented here. Knockout of *OsVIT1* and *OsVIT2* led to an increase in the Fe content in rice seeds (Fig 7). In WT plants, the iron deposition is mainly observed in the embryo's scutellum, while the *osvit1/2* mutants displayed stronger and more diffused concentration through the embryo. The total metal quantification in brown rice seeds will be performed by ICP-OES analyses, as well as the metal distribution will be evaluated using μ XRF.

In conclusion, knockout of both Vacuolar Iron Transporters (VIT) rice genes led to an enhanced Fe deposition in the seeds without major ionic changes at the vegetative development. Despite the mutants' lower culm length at the reproductive stage, no impact on seed production was observed under control and Fe excess treatment. Although, *OsVIT1* and *OsVIT2* seem to play an important role in Fe storage and translocation to the seeds under Fe deprived environments. We were able to confirm the relevance of VIT proteins on the maintenance of Fe homeostasis in flag leaves and propose a possible involvement on Mg^{2+} and Cu^{2+} transport in rice plants. Certainly, more edited events need to be analyzed and ionic quantification of

tissues at the reproductive stage of development must be performed. These analyses will contribute to the knowledge of metal translocation in rice plants and further increase our knowledge about Fe accumulation in the polished rice grain for improving food security.

SUPPLEMENTAL MATERIAL

TABLE 1. Primer sequences

Oligonucleotide	Sequence 5'-3'
sgRNA VITs F	GGCACCATCTCCATGGGCCTCGGA
sgRNA VITs R	AAACTCCGAGGCCCATGGAGATGG
<i>OsVIT1</i> F	CATCCTCGCTCGTGCTCA
<i>OsVIT1</i> R	AGAGGGGTTCCGAGTTTTTC
<i>OsVIT2</i> F	CCTGTCCGGCGCCAA
<i>OsVIT2</i> R	CAAATAAAACTTTCTCCTCTTCTT
<i>OsVIT1 qPCR</i> F	CATGAGTATGGCCCTGTCGT
<i>OsVIT1 qPCR</i> R	ATGATGAGGTTTGAGCTGGG
<i>OsGAPDH</i> F	TCCAAGACCCTCATCTTTGG
<i>OsGAPDH</i> R	TCTTTGCTGGGAGCAGAAAT
<i>OsFER</i> F	GACCCCTGCTTCCGTGTG
<i>OsFER</i> R	GCTAGGCCAAAAGTTCGTCGA
<i>OsIRO2</i> F	CGGATTTGGGAACAGGACA
<i>OsIRO2</i> R	GTTCTGACGACTTTCTCCA

REFERENCES

(FAO) F and AO (2018) Production quantities of Rice, paddy by country.

Abbaspour N, Hurrell R and Kelishadi R (2014) Review on iron and its importance for human health. *J Res Med Sci* 19:164–174.

Abou-khalifa A, Misra AN and El-Azeem M Salem AK (2008) Effect of leaf cutting on physiological traits and yield of two rice cultivars. *African J Plant Sci* 2:147–150.

Aung MS and Masuda H (2020) How Does Rice Defend Against Excess Iron?:

Physiological and Molecular Mechanisms. *Front Plant Sci.* doi:
10.3389/fpls.2020.01102

Balk J and Schaedler TA (2014) Iron Cofactor Assembly in Plants. *Annu Rev Plant Biol* 65:125–153. doi: 10.1146/annurev-arplant-050213-035759

Banakar R, Alvarez Fernandez A, Díaz-Benito P, Abadia J, Capell T and Christou P (2017) Phytosiderophores determine thresholds for iron and zinc accumulation in biofortified rice endosperm while inhibiting the accumulation of cadmium. *J Exp Bot* 68:4983–4995. doi: 10.1093/jxb/erx304

Bashir K, Ishimaru Y and Nishizawa NK (2010a) Iron uptake and loading into rice grains. *Rice* 3:122–130. doi: 10.1007/s12284-010-9042-y

Bashir K, Ishimaru Y and Nishizawa NK (2010b) Iron uptake and loading into rice grains. *Rice* 3:122–130. doi: 10.1007/s12284-010-9042-y

Bashir K, Takahashi R, Akhtar S, Ishimaru Y, Nakanishi H and Nishizawa NK (2013) The knockdown of OsVIT2 and MIT affects iron localization in rice seed.

Berquó E, Garcia S and Lago T (2008) Pesquisa Nacional de Demografia e Saúde da Criança e da Mulher: PNDS 2006. doi: 10.1111/j.1466-8238.2006.00276.x

Briat J-F, Dubos C and Gaymard F (2014) Iron nutrition , biomass production , and plant product quality. *Cell Press* 1–8. doi: 10.1016/j.tplants.2014.07.005

Briat JF, Dubos C and Gaymard F (2015) Iron nutrition, biomass production, and plant product quality. *Trends Plant Sci* 20:33–40. doi: 10.1016/j.tplants.2014.07.005

Briat JF, Fobis-Loisy I, Grignon N, Lobréaux S, Pascal N, Savino G, Thoirion S, von Wirén N and Van Wuytswinkel O (1995) Cellular and molecular aspects of iron metabolism in plants. *Biol Cell* 84:69–81. doi: 10.1016/0248-4900(96)81320-7

Briat JF and Lobréaux S (1997) Iron transport and storage in plants. *Trends Plant Sci* 2:187–193. doi: 10.1016/S1360-1385(97)01033-9

Brinkman EK, Chen T, Amendola M and Van Steensel B (2014) Easy quantitative assessment of genome editing by sequence trace decomposition. *Nucleic Acids Res* 42:1–8. doi: 10.1093/nar/gku936

Camaschella C (2015) Iron-deficiency anemia. *N Engl J Med* 372:1832–1843. doi:

10.1056/NEJMra1401038

Camaschella C (2019) Iron deficiency. *Blood* 133:30–39. doi: 10.1182/blood-2018-05-815944

Che J, Yamaji N and Ma JF (2021) Role of a vacuolar iron transporter OsVIT2 in the distribution of iron to rice grains. *New Phytol* 172:19. doi: 10.1111/nph.17219

Che J, Yokosho K, Yamaji N and Ma JF (2019) A vacuolar phytosiderophore transporter alters iron and zinc accumulation in polished rice grains. *Plant Physiol* 181:276–288. doi: 10.1104/pp.19.00598

Connolly EL and Guerinot M Lou (2002) Iron stress in plants. *Genome Biol* 3:1024–1. doi: 10.1186/gb-2002-3-8-reviews1024

Connorton JM, Jones ER, Rodríguez-ramiro I and Fairweather-tait S (2017) Wheat Vacuolar Iron Transporter TaVIT2 Transports Fe and Mn and Is Effective for Biofortification. *Plant Physiol* 174:2434–2444. doi: 10.1104/pp.17.00672

Couturier J, Touraine B, Briat JF, Gaymard F and Rouhier N (2013) The iron-sulfur cluster assembly machineries in plants: Current knowledge and open questions. *Front Plant Sci* 4:1–22. doi: 10.3389/fpls.2013.00259

Curie C and Briat J-F (2003) Iron Transport and Signaling in Plants. *Annu Rev Plant Biol* 54:183–206. doi: 10.1146/annurev.arplant.54.031902.135018

Dowden CW and McNeill C (1932) A Clinical Study of Blood Iron and Hemoglobin. *Trans Am Climatol Clin Assoc* 48:1–21.

Doyle JJ and Doyle JL (1987) Rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. 11–15.

Durrett TP, Gassmann W and Rogers EE (2007) The FRD3-mediated efflux of citrate into the root vasculature is necessary for efficient iron translocation. *Plant Physiol* 144:197–205. doi: 10.1104/pp.107.097162

El-Brolosy MA, Kontarakis Z, Rossi A, Kuenze C, Günther S, Fukuda N, Kikhi K, Boezio GLM, Takacs CM, Lai SL et al. (2019) Genetic compensation triggered by mutant mRNA degradation. *Nature* 568:193–197. doi: 10.1038/s41586-019-1064-z

Fageria NK and Rabelo NA (1987) Tolerance of rice cultivars to iron toxicity. *J Plant*

Nutr 10:653–661. doi: 10.1080/01904168709363598

Frei M, Tetteh RN, Razafindrazaka AL, Fuh MA, Wu LB and Becker M (2016) Responses of rice to chronic and acute iron toxicity: genotypic differences and biofortification aspects. *Plant Soil* 408:149–161. doi: 10.1007/s11104-016-2918-x

Goto F, Yoshihara T, Shigemoto N, Toki S and Takaiwa F (1999) Iron fortification of rice seed by the soybean ferritin gene. *Nat Biotechnol* 17:282–286. doi: 10.1038/7029

Graham RD, Knez M and Welch RM (2012) How much nutritional iron deficiency in humans globally is due to an underlying zinc deficiency?, 1st ed. *Adv Agron*. doi: 10.1016/B978-0-12-394276-0.00001-9

Grillet L, Mari S and Schmidt W (2014) Iron in seeds - Loading pathways and subcellular localization. *Front Plant Sci* 4:1–8. doi: 10.3389/fpls.2013.00535

Grusak MA and Dellapenna D (1999) Improving the nutrient composition of plants to enhance human nutrition and health. *Annu Rev Plant Biol* 50:133–161. doi: 10.1146/annurev.arplant.50.1.133

Guerinot ML and Yi Ying (1994) Iron: Nutritious, noxious, and not readily available. *Plant Physiol* 104:815–820. doi: 10.1104/pp.104.3.815

Hahn F and Nekrasov V (2019) CRISPR/Cas precision: do we need to worry about off-targeting in plants? *Plant Cell Rep* 38:437–441. doi: 10.1007/s00299-018-2355-9

Hermans C, Conn SJ, Chen J, Xiao Q and Verbruggen N (2013) An update on magnesium homeostasis mechanisms in plants. *Metallomics* 5:1170–1183. doi: 10.1039/c3mt20223b

Hohmann S (2005) *Molecular Biology of Metal Homeostasis and Detoxification*.

Huang S, Wang P, Yamaji N and Ma JF (2020) Plant Nutrition for Human Nutrition: Hints from Rice Research and Future Perspectives. *Mol Plant* 13:825–835. doi: 10.1016/j.molp.2020.05.007

Inoue H, Kobayashi T, Nozoye T, Takahashi M, Kakei Y, Suzuki K, Nakazono M, Nakanishi H, Mori S and Nishizawa NK (2009a) Rice OsYSL15 is an iron-regulated iron (III)-deoxymugineic acid transporter expressed in the roots and is essential for

iron uptake in early growth of the seedlings. *J Biol Chem* 284:3470–3479. doi: 10.1074/jbc.M806042200

Inoue H, Kobayashi T, Nozoye T, Takahashi M, Kakei Y, Suzuki K, Nakazono M, Nakanishi H, Mori S and Nishizawa NK (2009b) Rice OsYSL15 Is an Iron-regulated Iron (III) -Deoxymugineic Acid Transporter Expressed in the Roots and Is Essential for Iron Uptake in Early Growth of the Seedlings. *J Biol Chem* 284:3470–3479. doi: 10.1074/jbc.M806042200

Ishimaru Y, Bashir K, Nakanishi H and Nishizawa NK (2011) The role of rice phenolics efflux transporter in solubilizing apoplasmic iron. *Plant Signal Behav* 6:1624–1626. doi: 10.4161/psb.6.10.17694

Ishimaru Y, Masuda H, Bashir K, Inoue H, Tsukamoto T, Takahashi M, Nakanishi H, Aoki N, Hirose T, Ohsugi R et al. (2010) Rice metal-nicotianamine transporter, OsYSL2, is required for the long-distance transport of iron and manganese. *Plant J* 62:379–390. doi: 10.1111/j.1365-313X.2010.04158.x

Ishimaru Y, Suzuki M, Tsukamoto T, Suzuki K, Nakazono M, Kobayashi T, Wada Y, Watanabe S, Matsubashi S, Takahashi M et al. (2006) Rice plants take up iron as an Fe³⁺-phytosiderophore and as Fe²⁺. *Plant J* 3:335–346. doi: 10.1111/j.1365-313X.2005.02624.x

Johnson AAT, Kyriacou B, Callahan DL, Carruthers L, Stangoulis J, Lombi E and Tester M (2011) Constitutive overexpression of the OsNAS gene family reveals single-gene strategies for effective iron- and zinc-biofortification of rice endosperm. *PLoS One*. doi: 10.1371/journal.pone.0024476

Karimi M, Inzé D and Depicker A (2002) GATEWAY" vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Trends Plant Sci* 7:193–195. doi: 10.1016/S1360-1385(02)02251-3

Kato T, Kumazaki K, Wada M, Taniguchi R, Nakane T, Yamashita K, Hirata K, Ishitani R, Ito K, Nishizawa T et al. (2019) Crystal structure of plant vacuolar iron transporter VIT1. *Nat Plants* 5:308–315. doi: 10.1038/s41477-019-0367-2

Kawakami Y and Bhullar NK (2018) Molecular processes in iron and zinc homeostasis and their modulation for biofortification in rice. *J Integr Plant Biol*

60:1181–1198. doi: 10.1111/jipb.12751

Kim SA and Guerinot M Lou (2007a) Mining iron: Iron uptake and transport in plants. *FEBS Lett* 581:2273–2280. doi: 10.1016/j.febslet.2007.04.043

Kim SA and Guerinot M Lou (2007b) Mining iron: Iron uptake and transport in plants. *FEBS Lett* 581:2273–2280. doi: 10.1016/j.febslet.2007.04.043

Kim SA, Punshon T, Lanzirrotti A, Li A, Alonso JM, Ecker JR, Kaplan J and Guerinot M Lou (2006) Localization of iron in Arabidopsis seed requires the vacuolar membrane transporter VIT1. *Science* (80-). doi: 10.1126/science.1132563

Kobayashi T and Nishizawa NK (2012) Iron Uptake , Translocation , and Regulation in Higher Plants. *plant Biol* 131–152. doi: 10.1146/annurev-arplant-042811-105522

Kortman GAM, Raffatellu M, Swinkels DW and Tjalsma H (2014) Nutritional iron turned inside out: Intestinal stress from a gut microbial perspective. *FEMS Microbiol Rev* 38:1202–1234. doi: 10.1111/1574-6976.12086

Lee S and An G (2009) Over-expression of OsIRT1 leads to increased iron and zinc accumulations in rice. 408–416. doi: 10.1111/j.1365-3040.2009.01935.x

Lee S, Chiecko JC, Kim SA, Walker EL, Lee Y, Guerinot M Lou and An G (2009) Disruption of OsYSL15 leads to iron inefficiency in rice plants 1[C][W][OA]. *Plant Physiol* 150:786–800. doi: 10.1104/pp.109.135418

Li J, Manghwar H, Sun L, Wang P, Wang G, Sheng H, Zhang J, Liu H, Qin L, Rui H et al. (2019) Whole genome sequencing reveals rare off-target mutations and considerable inherent genetic or/and somaclonal variations in CRISPR/Cas9-edited cotton plants. *Plant Biotechnol J* 17:858–868. doi: 10.1111/pbi.13020

Li L, Chen OS, Ward DM and Kaplan J (2001) CCC1 Is a Transporter That Mediates Vacuolar Iron Storage in Yeast*. *J Biol Chem* 276:29515–29519. doi: 10.1074/jbc.M103944200

Liu X, Jin W and Theil EC (2003) Opening protein pores with chaotropes enhances Fe reduction and chelation of Fe from the ferritin biomineral. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:3653–3658. doi: 10.1073/pnas.0636928100

Livak KJ and Schmittgen TD (2008) Analysis of Relative Gene Expression Data

Using RealTime Quantitative PCR and the 22DDCT Method. *Asian Perspective*. pp 139–169

Lopez A, Cacoub P, Macdougall IC and Peyrin-Biroulet L (2016) Iron deficiency anaemia. *The Lancet*. pp 907–916

Lynch SR (2011) Why Nutritional Iron Deficiency Persists as a worldwide problem. 763–768. doi: 10.3945/jn.110.130609.billion

Masuda H, Ishimaru Y, Aung MS, Kobayashi T, Kakei Y, Takahashi M, Higuchi K, Nakanishi H and Nishizawa NK (2012a) Iron biofortification in rice by the introduction of multiple genes involved in iron nutrition. *Sci Rep*. doi: 10.1038/srep00543

Masuda H, Ishimaru Y, Aung MS, Kobayashi T, Kakei Y, Takahashi M, Higuchi K, Nakanishi H and Nishizawa NK (2012b) Iron biofortification in rice by the introduction of multiple genes involved in iron nutrition. *Sci Rep*. doi: 10.1038/srep00543

Momono K, Yoshida K, Mano S, Takahashi H, Nakamori C, Shoji K, Nitta A and Nishimura M (2009) A vacuolar iron transporter in tulip, TgVit1, is responsible for blue coloration in petal cells through iron accumulation. *Plant J* 59:437–447. doi: 10.1111/j.1365-313X.2009.03879.x

Moore KL, Chen Y, van de Meene AML, Hughes L, Liu W, Geraki T, Mosselmans F, Mcgrath SP, Grovenor C and Zhao FJ (2014) Combined NanoSIMS and synchrotron X-ray fluorescence reveal distinct cellular and subcellular distribution patterns of trace elements in rice tissues. *New Phytol* 201:104–115. doi: 10.1111/nph.12497

Morrissey J and Guerinot M Lou (2009) Iron uptake and transport in plants: The good, the bad, and the ionome. *Chem Rev* 109:4553–4567. doi: 10.1021/cr900112r

Mu S, Yamaji N, Sasaki A, Luo L, Du B, Che J, Shi H, Zhao H, Huang S, Deng F et al. (2021) A transporter for delivering zinc to the developing tiller bud and panicle in rice. *Plant J*. doi: 10.1111/tpj.15073

Ogo Y, Itai RN, Nakanishi H, Inoue H, Kobayashi T, Suzuki M, Takahashi M, Mori S and Nishizawa NK (2006) Isolation and characterization of IRO2, a novel iron-regulated bHLH transcription factor in graminaceous plants. *J Exp Bot* 57:2867–2878. doi: 10.1093/jxb/erl054

Ozawa K (2009) Establishment of a high efficiency Agrobacterium-mediated

transformation system of rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Sci* 176:522–527. doi: 10.1016/j.plantsci.2009.01.013

Qu LQ, Yoshihara T, Ooyama A, Goto F and Takaiwa F (2005) Iron accumulation does not parallel the high expression level of ferritin in transgenic rice seeds. *Planta* 222:225–233. doi: 10.1007/s00425-005-1530-8

Ram H, Sardar S and Gandass N (2021) Vacuolar Iron Transporter (Like) Proteins: Regulators of Cellular Iron Accumulation in Plants. *Physiol Plant* 0–3. doi: 10.1111/ppl.13363

Ricachenevsky FK and Sperotto RA (2014) There and back again, or always there? The evolution of rice combined strategy for Fe uptake. *Front Plant Sci* 5:1–5. doi: 10.3389/fpls.2014.00189

Santos RS, Araujo Junior AT, Pegoraro C and Oliveira AC (2017) Dealing with iron metabolism in rice: from breeding for stress tolerance to biofortification. *Genet Mol Biol* 40:312–325. doi: 10.1590/1678-4685-GMB-2016-0036

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* 84:374–384. doi: 10.1111/tpj.13005

Schindwein CCD, Fett-Neto AG and Dillenburg LR (2006) Chemical and mechanical changes during leaf expansion of four woody species of a dry Restinga woodland. *Plant Biol* 8:430–438. doi: 10.1055/s-2005-873042

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* 0:0. doi: 10.1007/s11103-017-0656-y

Slavic K, Krishna S, Lahree A, Bouyer G, Hanson KK, Vera I, Pittman JK, Staines HM and Mota MM (2016) A vacuolar iron-transporter homologue acts as a detoxifier in *Plasmodium*. *Nat Commun*. doi: 10.1038/ncomms10403

Sperotto RA (2013) Zn/Fe remobilization from vegetative tissues to rice seeds: Should I stay or should I go? Ask Zn/Fe supply! *Front Plant Sci* 4:1–4. doi: 10.3389/fpls.2013.00464

- Stein RJ, Ricachenevsky FK and Fett JP (2009) Differential regulation of the two rice ferritin genes (OsFER1 and OsFER2). *Plant Sci* 177:563–569. doi: 10.1016/j.plantsci.2009.08.001
- Von Grebmer K, Saltzman A, Birol E, Wiesmann D, Prasai N, Yin S, Yohannes Y, Menon P, Thompson J and Sonntag A (2014) Global Hunger Index: The Challenge of Hidden Hunger. October. doi: 10.2499/9780896299580
- Von Wirén N, Klair S, Bansal S, Briat JF, Khodr H, Shioiri T, Leigh RA and Hider RC (1999) Nicotianamine chelates both Fe(III) and Fe(II) implications for metal transport in plants. *Plant Physiol* 119:1107–1114. doi: 10.1104/pp.119.3.1107
- White PJ and Broadley MR (2005) Biofortifying crops with essential mineral elements. *Trends Plant Sci* 10:586–593. doi: 10.1016/j.tplants.2005.10.001
- World Health Organization (2001) Iron Deficiency Anemia. Iron Deficiency Anemia. Assessment, Prevention and Control: A guide for program managers. p 29
- Xie K and Yang Y (2013) RNA-Guided genome editing in plants using a CRISPR-Cas system. *Mol Plant* 6:1975–1983. doi: 10.1093/mp/sst119
- Yamaji N and Ma JF (2017) Node-controlled allocation of mineral elements in Poaceae. *Curr Opin Plant Biol* 39:18–24. doi: 10.1016/j.pbi.2017.05.002
- Yamaji N and Ma JF (2014) The node, a hub for mineral nutrient distribution in graminaceous plants. *Trends Plant Sci* 19:556–563. doi: 10.1016/j.tplants.2014.05.007
- 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* 162:927–939. doi: 10.1104/pp.113.216564
- 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* 67:5485–5494. doi: 10.1093/jxb/erw314
- Yokosho K, Yamaji N, Ueno D, Mitani N and Feng Ma J (2009) OsFRDL1 Is a Citrate Transporter Required for Efficient Translocation of Iron in Rice 1. *Plant Physiol* 149:297–305. doi: 10.1104/pp.108.128132
- Yoshida K and Negishi T (2013) The identification of a vacuolar iron transporter

involved in the blue coloration of cornflower petals. *Phytochemistry* 94:60–67. doi: 10.1016/j.phytochem.2013.04.017

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* 72:400–410. doi: 10.1111/j.1365-313X.2012.05088.x

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A análise genotípica dos mutantes *osvit1/2* nos permitiu selecionar dois genótipos com distintas mutações para análise fenotípicas e iônicas, com o intuito de melhor elucidar o papel desses genes na translocação de ferro em plantas de arroz. Os genes *OsVIT1* e *OsVIT2* são responsáveis pelo armazenamento de Fe em tecidos vegetativos e, uma vez que não estejam funcionais, ocorre a translocação do metal até as sementes de arroz (Fig 7) (Zhang et al. 2012; Che et al. 2021). A fenotipagem dos mutantes *osvit1/2* revelou perfis fenotípicos distintos (Fig 2, 4, 5 e 6) evidenciando a necessidade da análise de mais genótipos para que possamos confirmar que as diferenças observadas entre mutantes e plantas selvagens se devem apenas em decorrência da ausência dos genes VIT. No entanto, algumas características foram altamente consistentes entre os dois mutantes. A menor concentração de Cu^{2+} na base da parte aérea (Fig 4C) e de Mg^{2+} em diversos tecidos (Fig 5C) nos leva a propor um possível envolvimento dos genes VIT no transporte desses prótons divalentes, dado que os transportadores tiveram apenas suas capacidades de transporte de Fe^{2+} , Zn^{2+} e Cd^{2+} testadas (Zhang et al. 2012).

O maior acúmulo de Fe nas sementes dos mutantes *osvit1/2* (Fig 7) evidencia o envolvimento dos transportadores vacuolares no armazenamento de Fe em tecidos vegetativos, indisponibilizando o transporte às sementes. Quantificações iônicas em tecidos vegetais, folhas bandeira e sementes de plantas tratadas com excesso e deficiência de ferro até a maturidade das sementes já estão em desenvolvimento. Isto permitirá um melhor entendimento da translocação de Fe entre tecidos fonte e dreno, assim como ajudará a elucidar o envolvimento dos transportadores vacuolares nesse processo. Da mesma forma, o mapeamento da distribuição de metais nas sementes *osvit1/2* através de Micro Rio-X de fluorescência está em andamento. Tendo em vista que a camada de aleurona é um local de grande acúmulo de ferro devido a expressão do gene *osvit2*, o mapeamento da distribuição de metais nos mutantes *osvit1/2* nos auxiliará a compreender o processo de redistribuição de Fe nas sementes de arroz na ausência de armazenamento vacuolar.

Em paralelo, pouco se conhece sobre a origem do ferro translocado para as sementes de arroz além do fato de as raízes e folhas bandeira serem as principais

fontes. Sendo assim, fornecemos um pulso de 10 mM de ^{57}Fe às raízes de plantas selvagens e aos mutantes *osvit1/2*, quando as plantas atingiram a antese, e pulsos de 10 mM e 100 mM às folhas bandeiras (que tiveram suas pontas embebidas na solução contendo o isótopo). Infelizmente o experimento ainda está em desenvolvimento, entretanto os resultados auxiliarão na proposição de um modelo mais específico sobre a translocação de Fe após o florescimento em plantas de arroz, bem como do papel dos genes VIT nesse processo.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbaspour N, Hurrell R and Kelishadi R (2014) Review on iron and its importance for human health. *J Res Med Sci* 19:164–174.
- Abou-khalifa A, Misra AN and El-Azeem M Salem AK (2008) Effect of leaf cutting on physiological traits and yield of two rice cultivars. *African J Plant Sci* 2:147–150.
- Aung MS and Masuda H (2020) How Does Rice Defend Against Excess Iron?: Physiological and Molecular Mechanisms. *Front Plant Sci*. doi: 10.3389/fpls.2020.01102
- Balk J and Schaedler TA (2014) Iron Cofactor Assembly in Plants. *Annu Rev Plant Biol* 65:125–153. doi: 10.1146/annurev-arplant-050213-035759
- Banakar R, Alvarez Fernandez A, Díaz-Benito P, Abadia J, Capell T and Christou P (2017) Phytosiderophores determine thresholds for iron and zinc accumulation in biofortified rice endosperm while inhibiting the accumulation of cadmium. *J Exp Bot* 68:4983–4995. doi: 10.1093/jxb/erx304
- Bashir K, Ishimaru Y and Nishizawa NK (2010a) Iron uptake and loading into rice grains. *Rice* 3:122–130. doi: 10.1007/s12284-010-9042-y
- Bashir K, Ishimaru Y and Nishizawa NK (2010b) Iron uptake and loading into rice grains. *Rice* 3:122–130. doi: 10.1007/s12284-010-9042-y
- Bashir K, Takahashi R, Akhtar S, Ishimaru Y, Nakanishi H and Nishizawa NK (2013) The knockdown of OsVIT2 and MIT affects iron localization in rice seed.
- Berquó E, Garcia S and Lago T (2008) Pesquisa Nacional de Demografia e Saúde da Criança e da Mulher: PNDS 2006. doi: 10.1111/j.1466-8238.2006.00276.x
- Briat J-F, Dubos C and Gaymard F (2014) Iron nutrition , biomass production , and plant product quality. *Cell Press* 1–8. doi: 10.1016/j.tplants.2014.07.005
- Briat JF, Dubos C and Gaymard F (2015) Iron nutrition, biomass production, and plant product quality. *Trends Plant Sci* 20:33–40. doi: 10.1016/j.tplants.2014.07.005
- Briat JF, Fobis-Loisy I, Grignon N, Lobréaux S, Pascal N, Savino G, Thoirion S, von Wirén N and Van Wuytswinkel O (1995) Cellular and molecular aspects of iron

metabolism in plants. *Biol Cell* 84:69–81. doi: 10.1016/0248-4900(96)81320-7

Briat JF and Lobréaux S (1997) Iron transport and storage in plants. *Trends Plant Sci* 2:187–193. doi: 10.1016/S1360-1385(97)01033-9

Brinkman EK, Chen T, Amendola M and Van Steensel B (2014) Easy quantitative assessment of genome editing by sequence trace decomposition. *Nucleic Acids Res* 42:1–8. doi: 10.1093/nar/gku936

Camaschella C (2015) Iron-deficiency anemia. *N Engl J Med* 372:1832–1843. doi: 10.1056/NEJMra1401038

Camaschella C (2019) Iron deficiency. *Blood* 133:30–39. doi: 10.1182/blood-2018-05-815944

Che J, Yamaji N and Ma JF (2021) Role of a vacuolar iron transporter OsVIT2 in the distribution of iron to rice grains. *New Phytol* nph.17219. doi: 10.1111/nph.17219

Che J, Yokosho K, Yamaji N and Ma JF (2019) A vacuolar phytosiderophore transporter alters iron and zinc accumulation in polished rice grains. *Plant Physiol* 181:276–288. doi: 10.1104/pp.19.00598

Connolly EL and Guerinot M Lou (2002) Iron stress in plants. *Genome Biol* 3:1024–1. doi: 10.1186/gb-2002-3-8-reviews1024

Connorton JM, Jones ER, Rodríguez-ramiro I and Fairweather-tait S (2017) Wheat Vacuolar Iron Transporter TaVIT2 Transports Fe and Mn and Is Effective for Biofortification 1. *174:2434–2444*. doi: 10.1104/pp.17.00672

Couturier J, Touraine B, Briat JF, Gaymard F and Rouhier N (2013) The iron-sulfur cluster assembly machineries in plants: Current knowledge and open questions. *Front Plant Sci* 4:1–22. doi: 10.3389/fpls.2013.00259

Curie C and Briat J-F (2003) Iron Transport and Signaling in Plants. *Annu Rev Plant Biol* 54:183–206. doi: 10.1146/annurev.arplant.54.031902.135018

Dowden CW and McNeill C (1932) A Clinical Study of Blood Iron and Hemoglobin. *Trans Am Climatol Clin Assoc* 48:1–21.

Doyle JJ and Doyle JL (1987) Rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. 11–15.

Durrett TP, Gassmann W and Rogers EE (2007) The FRD3-mediated efflux of citrate into the root vasculature is necessary for efficient iron translocation. *Plant Physiol* 144:197–205. doi: 10.1104/pp.107.097162

El-Brolosy MA, Kontarakis Z, Rossi A, Kuenne C, Günther S, Fukuda N, Kikhi K, Boezio GLM, Takacs CM, Lai SL et al. (2019) Genetic compensation triggered by mutant mRNA degradation. *Nature* 568:193–197. doi: 10.1038/s41586-019-1064-z

Fageria NK and Rabelo NA (1987) Tolerance of rice cultivars to iron toxicity. *J Plant Nutr* 10:653–661. doi: 10.1080/01904168709363598

(FAO) F and AO (2018) Production quantities of Rice, paddy by country.

Frei M, Tetteh RN, Razafindrazaka AL, Fuh MA, Wu LB and Becker M (2016) Responses of rice to chronic and acute iron toxicity: genotypic differences and biofortification aspects. *Plant Soil* 408:149–161. doi: 10.1007/s11104-016-2918-x

Goto F, Yoshihara T, Shigemoto N, Toki S and Takaiwa F (1999) Iron fortification of rice seed by the soybean ferritin gene. *Nat Biotechnol* 17:282–286. doi: 10.1038/7029

Graham RD, Knez M and Welch RM (2012) How much nutritional iron deficiency in humans globally is due to an underlying zinc deficiency?, 1st ed. *Adv Agron*. doi: 10.1016/B978-0-12-394276-0.00001-9

Grillet L, Mari S and Schmidt W (2014) Iron in seeds - Loading pathways and subcellular localization. *Front Plant Sci* 4:1–8. doi: 10.3389/fpls.2013.00535

Grusak MA and Dellapenna D (1999) Improving the nutrient composition of plants to enhance human nutrition and health. *Annu Rev Plant Biol* 50:133–161. doi: 10.1146/annurev.arplant.50.1.133

Guerinot ML and Yi Ying (1994) Iron: Nutritious, noxious, and not readily available. *Plant Physiol* 104:815–820. doi: 10.1104/pp.104.3.815

Hahn F and Nekrasov V (2019) CRISPR/Cas precision: do we need to worry about off-targeting in plants? *Plant Cell Rep* 38:437–441. doi: 10.1007/s00299-018-2355-9

Hermans C, Conn SJ, Chen J, Xiao Q and Verbruggen N (2013) An update on magnesium homeostasis mechanisms in plants. *Metallomics* 5:1170–1183. doi:

10.1039/c3mt20223b

Hohmann S (2005) *Molecular Biology of Metal Homeostasis and Detoxification*.

Huang S, Wang P, Yamaji N and Ma JF (2020) Plant Nutrition for Human Nutrition: Hints from Rice Research and Future Perspectives. *Mol Plant* 13:825–835. doi: 10.1016/j.molp.2020.05.007

Inoue H, Kobayashi T, Nozoye T, Takahashi M, Kakei Y, Suzuki K, Nakazono M, Nakanishi H, Mori S and Nishizawa NK (2009a) Rice OsYSL15 is an iron-regulated iron (III)-deoxymugineic acid transporter expressed in the roots and is essential for iron uptake in early growth of the seedlings. *J Biol Chem* 284:3470–3479. doi: 10.1074/jbc.M806042200

Inoue H, Kobayashi T, Nozoye T, Takahashi M, Kakei Y, Suzuki K, Nakazono M, Nakanishi H, Mori S and Nishizawa NK (2009b) Rice OsYSL15 Is an Iron-regulated Iron (III) -Deoxymugineic Acid Transporter Expressed in the Roots and Is Essential for Iron Uptake in Early Growth of the Seedlings. *J Biol Chem* 284:3470–3479. doi: 10.1074/jbc.M806042200

Ishimaru Y, Bashir K, Nakanishi H and Nishizawa NK (2011) The role of rice phenolics efflux transporter in solubilizing apoplasmic iron. *Plant Signal Behav* 6:1624–1626. doi: 10.4161/psb.6.10.17694

Ishimaru Y, Masuda H, Bashir K, Inoue H, Tsukamoto T, Takahashi M, Nakanishi H, Aoki N, Hirose T, Ohsugi R et al. (2010) Rice metal-nicotianamine transporter, OsYSL2, is required for the long-distance transport of iron and manganese. *Plant J* 62:379–390. doi: 10.1111/j.1365-313X.2010.04158.x

Ishimaru Y, Suzuki M, Tsukamoto T, Suzuki K, Nakazono M, Kobayashi T, Wada Y, Watanabe S, Matsuhashi S, Takahashi M et al. (2006) Rice plants take up iron as an Fe³⁺-phytosiderophore and as Fe²⁺. *Plant J* 3:335–346. doi: 10.1111/j.1365-313X.2005.02624.x

Johnson AAT, Kyriacou B, Callahan DL, Carruthers L, Stangoulis J, Lombi E and Tester M (2011) Constitutive overexpression of the OsNAS gene family reveals single-gene strategies for effective iron- and zinc-biofortification of rice endosperm. *PLoS One*. doi: 10.1371/journal.pone.0024476

Karimi M, Inzé D and Depicker A (2002) GATEWAY" vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Trends Plant Sci* 7:193–195. doi: 10.1016/S1360-1385(02)02251-3

Kato T, Kumazaki K, Wada M, Taniguchi R, Nakane T, Yamashita K, Hirata K, Ishitani R, Ito K, Nishizawa T et al. (2019) Crystal structure of plant vacuolar iron transporter VIT1. *Nat Plants* 5:308–315. doi: 10.1038/s41477-019-0367-2

Kawakami Y and Bhullar NK (2018) Molecular processes in iron and zinc homeostasis and their modulation for biofortification in rice. *J Integr Plant Biol* 60:1181–1198. doi: 10.1111/jipb.12751

Kim SA and Guerinot M Lou (2007a) Mining iron: Iron uptake and transport in plants. *FEBS Lett* 581:2273–2280. doi: 10.1016/j.febslet.2007.04.043

Kim SA and Guerinot M Lou (2007b) Mining iron: Iron uptake and transport in plants. *FEBS Lett* 581:2273–2280. doi: 10.1016/j.febslet.2007.04.043

Kim SA, Punshon T, Lanzirrotti A, Li A, Alonso JM, Ecker JR, Kaplan J and Guerinot M Lou (2006) Localization of iron in Arabidopsis seed requires the vacuolar membrane transporter VIT1. *Science* (80-). doi: 10.1126/science.1132563

Kobayashi T and Nishizawa NK (2012) Iron Uptake , Translocation , and Regulation in Higher Plants. *plant Biol* 131–152. doi: 10.1146/annurev-arplant-042811-105522

Kortman GAM, Raffatellu M, Swinkels DW and Tjalsma H (2014) Nutritional iron turned inside out: Intestinal stress from a gut microbial perspective. *FEMS Microbiol Rev* 38:1202–1234. doi: 10.1111/1574-6976.12086

Lee S and An G (2009) Over-expression of OsIRT1 leads to increased iron and zinc accumulations in rice. 408–416. doi: 10.1111/j.1365-3040.2009.01935.x

Lee S, Chiecko JC, Kim SA, Walker EL, Lee Y, Guerinot M Lou and An G (2009) Disruption of OsYSL15 leads to iron inefficiency in rice plants 1[C][W][OA]. *Plant Physiol* 150:786–800. doi: 10.1104/pp.109.135418

Li J, Manghwar H, Sun L, Wang P, Wang G, Sheng H, Zhang J, Liu H, Qin L, Rui H et al. (2019) Whole genome sequencing reveals rare off-target mutations and considerable inherent genetic or/and somaclonal variations in CRISPR/Cas9-edited cotton plants. *Plant Biotechnol J* 17:858–868. doi: 10.1111/pbi.13020

Li L, Chen OS, Ward DM and Kaplan J (2001) CCC1 Is a Transporter That Mediates Vacuolar Iron Storage in Yeast*. *J Biol Chem* 276:29515–29519. doi: 10.1074/jbc.M103944200

Liu X, Jin W and Theil EC (2003) Opening protein pores with chaotropes enhances Fe reduction and chelation of Fe from the ferritin biomineral. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:3653–3658. doi: 10.1073/pnas.0636928100

Livak KJ and Schmittgen TD (2008) Analysis of Relative Gene Expression Data Using RealTime Quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT} Method. *Asian Perspective*. pp 139–169

Lopez A, Cacoub P, Macdougall IC and Peyrin-Biroulet L (2016) Iron deficiency anaemia. *The Lancet*. pp 907–916

Lynch SR (2011) Why Nutritional Iron Deficiency Persists as a worldwide problem. 763–768. doi: 10.3945/jn.110.130609.billion

Masuda H, Ishimaru Y, Aung MS, Kobayashi T, Takei Y, Takahashi M, Higuchi K, Nakanishi H and Nishizawa NK (2012a) Iron biofortification in rice by the introduction of multiple genes involved in iron nutrition. *Sci Rep*. doi: 10.1038/srep00543

Masuda H, Ishimaru Y, Aung MS, Kobayashi T, Takei Y, Takahashi M, Higuchi K, Nakanishi H and Nishizawa NK (2012b) Iron biofortification in rice by the introduction of multiple genes involved in iron nutrition. *Sci Rep*. doi: 10.1038/srep00543

Momonoi K, Yoshida K, Mano S, Takahashi H, Nakamori C, Shoji K, Nitta A and Nishimura M (2009) A vacuolar iron transporter in tulip, TgVit1, is responsible for blue coloration in petal cells through iron accumulation. *Plant J* 59:437–447. doi: 10.1111/j.1365-313X.2009.03879.x

Moore KL, Chen Y, van de Meene AML, Hughes L, Liu W, Geraki T, Mosselmans F, Mcgrath SP, Grovenor C and Zhao FJ (2014) Combined NanoSIMS and synchrotron X-ray fluorescence reveal distinct cellular and subcellular distribution patterns of trace elements in rice tissues. *New Phytol* 201:104–115. doi: 10.1111/nph.12497

Morrissey J and Guerinot M Lou (2009) Iron uptake and transport in plants: The good, the bad, and the ionome. *Chem Rev* 109:4553–4567. doi: 10.1021/cr900112r

Mu S, Yamaji N, Sasaki A, Luo L, Du B, Che J, Shi H, Zhao H, Huang S, Deng F et

al. (2021) A transporter for delivering zinc to the developing tiller bud and panicle in rice. *Plant J*. doi: 10.1111/tpj.15073

Ogo Y, Itai RN, Nakanishi H, Inoue H, Kobayashi T, Suzuki M, Takahashi M, Mori S and Nishizawa NK (2006) Isolation and characterization of IRO2, a novel iron-regulated bHLH transcription factor in graminaceous plants. *J Exp Bot* 57:2867–2878. doi: 10.1093/jxb/erl054

Ozawa K (2009) Establishment of a high efficiency *Agrobacterium*-mediated transformation system of rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Sci* 176:522–527. doi: 10.1016/j.plantsci.2009.01.013

Qu LQ, Yoshihara T, Ooyama A, Goto F and Takaiwa F (2005) Iron accumulation does not parallel the high expression level of ferritin in transgenic rice seeds. *Planta* 222:225–233. doi: 10.1007/s00425-005-1530-8

Ram H, Sardar S and Gandass N (2021) Vacuolar Iron Transporter (Like) Proteins: Regulators of Cellular Iron Accumulation in Plants. *Physiol Plant* 0–3. doi: 10.1111/ppl.13363

Ricachenevsky FK and Sperotto RA (2014) There and back again, or always there? The evolution of rice combined strategy for Fe uptake. *Front Plant Sci* 5:1–5. doi: 10.3389/fpls.2014.00189

Santos RS, Araujo Junior AT, Pegoraro C and Oliveira AC (2017) Dealing with iron metabolism in rice: from breeding for stress tolerance to biofortification. *Genet Mol Biol* 40:312–325. doi: 10.1590/1678-4685-GMB-2016-0036

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* 84:374–384. doi: 10.1111/tpj.13005

Sch lindwein CCD, Fett-Neto AG and Dillenburg LR (2006) Chemical and mechanical changes during leaf expansion of four woody species of a dry Restinga woodland. *Plant Biol* 8:430–438. doi: 10.1055/s-2005-873042

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* 0:0. doi: 10.1007/s11103-017-

0656-y

Slavic K, Krishna S, Lahree A, Bouyer G, Hanson KK, Vera I, Pittman JK, Staines HM and Mota MM (2016) A vacuolar iron-transporter homologue acts as a detoxifier in Plasmodium. *Nat Commun*. doi: 10.1038/ncomms10403

Sperotto RA (2013) Zn/Fe remobilization from vegetative tissues to rice seeds: Should I stay or should I go? Ask Zn/Fe supply! *Front Plant Sci* 4:1–4. doi: 10.3389/fpls.2013.00464

Stein RJ, Ricachenevsky FK and Fett JP (2009) Differential regulation of the two rice ferritin genes (OsFER1 and OsFER2). *Plant Sci* 177:563–569. doi: 10.1016/j.plantsci.2009.08.001

Von Grebmer K, Saltzman A, Birol E, Wiesmann D, Prasai N, Yin S, Yohannes Y, Menon P, Thompson J and Sonntag A (2014) Global Hunger Index: The Challenge of Hidden Hunger. October. doi: 10.2499/9780896299580

Von Wirén N, Klair S, Bansal S, Briat JF, Khodr H, Shioiri T, Leigh RA and Hider RC (1999) Nicotianamine chelates both Fe(III) and Fe(II) implications for metal transport in plants. *Plant Physiol* 119:1107–1114. doi: 10.1104/pp.119.3.1107

White PJ and Broadley MR (2005) Biofortifying crops with essential mineral elements. *Trends Plant Sci* 10:586–593. doi: 10.1016/j.tplants.2005.10.001

World Health Organization (2001) Iron Deficiency Anemia. Iron Deficiency Anemia. Assessment, Prevention and Control: A guide for program managers. p 29

Xie K and Yang Y (2013) RNA-Guided genome editing in plants using a CRISPR-Cas system. *Mol Plant* 6:1975–1983. doi: 10.1093/mp/sst119

Yamaji N and Ma JF (2017) Node-controlled allocation of mineral elements in Poaceae. *Curr Opin Plant Biol* 39:18–24. doi: 10.1016/j.pbi.2017.05.002

Yamaji N and Ma JF (2014) The node, a hub for mineral nutrient distribution in graminaceous plants. *Trends Plant Sci* 19:556–563. doi: 10.1016/j.tplants.2014.05.007

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* 162:927–939. doi: 10.1104/pp.113.216564

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* 67:5485–5494. doi: 10.1093/jxb/erw314

Yokosho K, Yamaji N, Ueno D, Mitani N and Feng Ma J (2009) OsFRDL1 Is a Citrate Transporter Required for Efficient Translocation of Iron in Rice 1. *Plant Physiol* 149:297–305. doi: 10.1104/pp.108.128132

Yoshida K and Negishi T (2013) The identification of a vacuolar iron transporter involved in the blue coloration of cornflower petals. *Phytochemistry* 94:60–67. doi: 10.1016/j.phytochem.2013.04.017

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* 72:400–410. doi: 10.1111/j.1365-313X.2012.05088.x