

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



Tese

**Mudanças fisiológicas e moleculares na cultura do arroz e em plantas
daninhas C₃ e C₄ submetidas a estresses abióticos**

Claudia de Oliveira

Pelotas, 2017

Claudia de Oliveira

**Mudanças fisiológicas e moleculares na cultura do arroz e em plantas
daninhas C₃ e C₄ submetidas a estresses abióticos**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Fitossanidade (área do conhecimento: Herbologia).

Orientador: Dr. Dirceu Agostinetto
Coorientadores: Ph.D. Luis Antonio Avila
Dra. Fabiane Pinto Lamego

Pelotas, 2017

Banca examinadora:

Paulo Régis Ferreira da Silva, Ph.D.

Daiane de Pinho Benemann, Dra.

Giovani Greigh de Brito, Dr.

Sidnei Deuner, Dr.

Dirceu Agostinetto, Dr.
(Orientador)

Aos meus pais, José e Sonia;
Aos meus irmãos, Marcelo e Mateus;
Aos meus amigos;

OFEREÇO E DEDICO

“Deus nos concede, a cada dia, uma página de vida nova no livro do tempo. Aquilo que colocarmos nela, corre por nossa conta.”

Chico Xavier

Agradecimentos

À Deus, pelo dom da vida e por ter-me proporcionado força e coragem durante o transcorrer dessa etapa.

Aos meus pais e irmãos, os responsáveis pela formação de meu caráter e personalidade, que sempre estiveram ao meu lado e com muito carinho, amor e confiança não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida.

Aos meus amigos que estiveram presentes em todos os momentos, constituindo minha segunda família.

Ao Professor Dirceu Agostinetto pela orientação, ensinamentos, confiança, conselhos, disponibilidade, mas principalmente pela amizade e pelo exemplo de caráter e ética; e por não ter medido esforços para ajudar-me na garantia do bom andamento da pesquisa.

Aos coorientadores Professora Fabiane Lamego e Professor Luis Antonio Avila pela amizade, incentivo, convívio e por ter contribuído para minha formação.

À Pós-Doutoranda Daiane Benemann, pela amizade, orientações e conselhos.

À Universidade Federal de Pelotas e ao Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade pela minha formação, oportunidade e estrutura oferecida para a realização do meu trabalho.

Ao Centro de Herbologia (CEHERB) por ter me abrigado e ter me formado profissionalmente e pessoalmente durante os onze anos de Graduação e Pós-Graduação.

A todos os colegas e amigos do CEHERB pela amizade, momentos de convívio e descontração, incentivo e auxílio na execução das atividades. Agradeço em especial aos alunos de Pós-Graduação Ana Claudia Langaro, André Ulguim,

Andres Vargas, Bruno da Silva, Daniela Tessaro, Edna Souza, Diego Fraga, Jader Franco, Jéssica Garcia, Joanei Cechin, Queli Ruchel, Laís Perboni, Renan Zandoná; e alunos de Graduação Humberto Farias, Jessica Silva, Lucas Thürmer, Marcelo Holz e Thiago Duarte. Essas pessoas também são responsáveis pelo conteúdo e qualidade desse trabalho.

À “University of Arkansas” e, em especial, à Dr. Nilda Roma Burgos pela excelente oportunidade, suporte na pesquisa, excepcional receptividade e orientação durante meu doutorado sanduíche.

Aos colegas e amigos da “University of Arkansas”: Christopher Rouse, João Paulo Refatti, Hussain Tahir, Leopoldo Estorninos, Leonard Piveta, Reiofeli Salas e Teal Penka. Igualmente, agradeço os amigos: Luca Bochi, Mariana Bragato, Redentor Burgos, Samantha Segalin pelos momentos de excelente convívio e amizade.

Ao Cnpq pelo apoio financeiro.

A todos os que contribuíram e não mediram esforços para a realização deste trabalho.

Resumo

OLIVEIRA, Claudia. **Mudanças fisiológicas e moleculares na cultura do arroz e em plantas daninhas C₃ e C₄ submetidas a estresses abióticos**. 2017. 166f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Devido às previsões de mudanças no clima, muitos estudos vêm sendo realizados com objetivo de prever o efeito de estresses abióticos sobre as plantas. O arroz, arroz-vermelho e capim-arroz têm sua morfologia, fisiologia, metabolismo e expressão de genes, modificadas por estresses abióticos, sendo que as espécies respondem de forma distinta aos estresses ambientais. Assim, os objetivos da pesquisa foram comparar alterações morfológicas, fisiológicas, bioquímicas e moleculares em plantas de arroz irrigado e plantas daninhas da cultura com via fotossintética C₃ e C₄, quando estas são submetidas a estresses por déficit hídrico, temperaturas supra ótimas e diferente qualidade de luz; e, avaliar o efeito de níveis de CO₂ em biótipos de *E. colona* com resistência múltipla a herbicidas. Os resultados permitem inferir que o arroz e arroz-vermelho apresentam respostas fisiológicas e moleculares semelhantes quando expostos a déficit hídrico e temperaturas supra ótimas, sendo observado nessas condições de estresse redução na fotossíntese, elevação de danos à biomoléculas e aumento na expressão de genes ligados a proteção à estresses abióticos, em ambas as plantas. Quanto a qualidade de luz, o arroz tem variáveis fisiológicas e de crescimento afetadas positivamente pela luz azul, já a luz vermelha aumenta apenas variáveis de crescimento e o arroz-vermelho apresenta, incremento nas variáveis de crescimento quando exposto a luz azul. Em um cenário de mudanças climáticas com déficit hídrico, temperatura supra ótimas e diferentes qualidades de luz e elevado [CO₂] atmosférico o capim-arroz, por ser C₄, é ainda mais competitivo com a cultura do arroz, pois ao contrário das plantas C₃, praticamente não apresenta mudanças fisiológicas e moleculares e aumenta o crescimento e produtividade em atmosferas com alta [CO₂]. Contudo, biótipos de capim-arroz com resistência múltipla a herbicidas, apresentam desvantagens adaptativas em ambientes alta [CO₂], em comparação ao biótipo suscetível.

Palavras-chave: Mudanças climáticas. *Oryza sativa*. *Echinochloa* spp. déficit hídrico. Temperatura. CO₂.

Abstract

OLIVEIRA, Claudia. **Physiological and molecular changes in rice and C3 and C4 weeds submitted to abiotic stresses**. 2017. 166f. Doctor - Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Due to predictions of climate change many studies have been realized to predict the effect of abiotic stresses on plants. Rice, weedy rice and barnyardgrass have their morphology, physiology and gene expression modified by abiotic stress, and these plants respond differently to environmental stress. The objective of the research was to compare morphological, physiological, biochemical and molecular changes in rice plants and weed of this crop with photosynthetic pathway C3 and C4 when the plants are submitted to stress due water deficit, supra-optimal temperature and different quality of light; and to evaluate the effect of CO₂ levels on *E. colona* biotypes with multiple herbicide resistance. Four studies were realized to meet the objectives, and the results allow to infer that: rice and weedy rice have similar physiological and molecular responses when exposed to water deficit and supra optimal temperatures, elevation damage to biomolecules and increased in gene expression linked to protection of abiotic stresses, in both plants. As for light quality, rice has physiological and growth variables positively affected by blue light whereas red light only increased growth variables, and weedy rice has increase in growth variables where exposed to blue light. In a climate change scenario, the C4 plant, barnyardgrass, is even more competitive with rice, because unlike the C3 plants, it practically does not present physiological and molecular change when exposed to water deficit, supra-optimal temperature, and different light qualities. Furthermore, barnyardgrass increases growth and productivity in atmospheres with high [CO₂], however, biotypes of herbicides-resistant barnyardgrass have fitness cost in high environments [CO₂] compared to susceptible biotype.

Key words: Climate change. *Oryza sativa*. *Echinochloa* spp.. Drought. Temperature. CO₂.

Lista de Figuras

- Figure 1 - The expression levels of different candidate reference genes 18SrRNA (18S), initiation factor 4 α eukaryotes (*Elf-4a*), β -Tubulin (β -*Tub*), ubiquitin-conjugating enzyme E2 (*UBC-E2*), and ubiquitin 10 (*UBQ10*). Expression data displayed as RT-qPCR quantification cycle (Cq) values for each reference gene in rice, weedy rice, and barnyardgrass submitted or not to drought for 5 days. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2015. 52
- Figure 2 - Expression stability of different candidate reference genes 18SrRNA (18S), initiation factor 4 α eukaryotes (*Elf-4a*), β -Tubulin (β -*Tub*), ubiquitin-conjugating enzyme E2 (*UBC-E2*), and ubiquitin 10 (*UBQ10*) in rice, weedy rice, and barnyardgrass subjected or not to drought calculated by the comparative delta-Ct method (A), BestKeeper (B), NormFinder (C), geNorm (D), and RefFinder. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2015. 54
- Figure 3 - Pairwise variation (V) calculated by geNorm to determine the minimum number of reference genes for accurate normalization in rice, weedy rice, and barnyardgrass subjected or not to drought. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2015. 56
- Figure 4 - Relative expression (RQ) profiles of *OsAPX2* (A), *OsHSP24.15* (B), *OsHSP71.10* (C) and *OsHSP81.88* in rice, weedy rice, and barnyardgrass subjected or not to water deficit. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2015. 57
- Figura 5 - Nível de expressão dos genes endógenos RNA ribossômico 18S (18S), fator de iniciação de eucarioto 4- α (*Elf-4a*), β -Tubulina (β -*Tub*) e ubiquitina-conjugada enzima E2 (*UBC-E2*). Dados da expressão referentes aos valores dos ciclos de quantificação (Cq) em RT-qPCR para cada um dos quatro genes em arroz, arroz-vermelho e capim-arroz submetidos aos tratamentos nas temperaturas. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2014. 96
- Figura 6 - Estabilidade de expressão dos genes endógenos RNA ribossômico 18S (18S), fator de iniciação de eucarioto 4- α (*Elf-4a*), β -Tubulina (β -*Tub*) e ubiquitina-conjugada enzima E2 (*UBC-E2*) em arroz, arroz-vermelho e capim-arroz expostos as temperaturas de 25 e 40°C, calculados pelos algoritmos comparativos delta-Ct (A), BestKeeper (B), NormFinder (C), geNorm (D) e RefFinder (E). FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2014... 97

- Figura 7 - Variação em pares (V) calculada pelo programa geNorm para determinar o número mínimo de genes referência necessários para a normalização de amostras de arroz, arroz-vermelho e capim-arroz expostos as temperaturas de 25 e 40°C. FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2015..... 99
- Figura 8 - Quantificação relativa (QR) da expressão do gene *OsAPX2* as 28 horas (A), gene *OsAPX2* as 32 horas (B), gene *OsHSP24.15* as 28 horas (C), gene *OsHSP24.15* as 32 (D), gene *OsHSP71.10* as 28 horas (E); e *OsHSP71.10* as 32 horas (F), em arroz, arroz-vermelho e capim-arroz expostos a temperatura de 25 e 40°C. FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2015.. ... 100
- Figura 9 - Número de afilhos em *E. colona* suscetível e resistente a herbicidas cultivados nas concentrações de 400 e 700 $\mu\text{L L}^{-1}$ de CO_2 . UARK, Fayetteville/AR/EUA, 2016. 126
- Figura 10 - Número de afilhos em *E. colona* suscetível e resistente a herbicidas cultivados nas concentrações de 400 e 700 $\mu\text{L L}^{-1}$ de CO_2 . UARK, Fayetteville/AR/EUA, 2016. 127
- Figura 11 - Condutância estomática (*gs*) (A), concentração subestática de CO_2 (*Ci*) (B) e taxa de transpiração (*E*) (C) de *E. colona* cultivadas nas concentrações de 400 e 700 $\mu\text{L L}^{-1}$ de CO_2 , na média dos biótipos suscetível e resistente a herbicidas. UARK, Fayetteville/AR/EUA, 2016. 128
- Figura 12 - Área foliar (AF) (A), número de panículas por plantas (B), sementes por panícula (C) e produtividade por planta (D) *E. colona* suscetível e resistente a herbicidas, crescendo nas concentrações de 400 e 700 $\mu\text{L L}^{-1}$ de CO_2 . UARK, Fayetteville/AR/EUA, 2016. 129
- Figura 13 - Massa seca de parte aérea (MSPA) (A) e massa seca de raiz (MSR) (B) de *E. colona* cultivadas nas concentrações de 400 e 700 $\mu\text{L L}^{-1}$ de CO_2 na média dos biótipos suscetível e resistente a herbicidas. UARK, Fayetteville/AR/EUA, 2016..... 130
- Figura 14 - Germinação de sementes (A) e sementes não viáveis (B) produzidas em plantas de *E. colona* suscetível e resistente a herbicidas cultivado nas concentrações de 400 e 700 $\mu\text{L L}^{-1}$ de CO_2 . UARK, Fayetteville/AR/EUA, 2016. 131
- Figura 15 - Quantificação relativa (QR) do perfil de expressão dos genes *EcRbcS1*(A), *EcSODcu/zn* (B), *EcGST1* (C), *CYP81A12* (D) e *Elf-4b* (E) em *E. colona* suscetível e resistente a herbicidas crescendo nas concentrações de 400 e 700 $\mu\text{L L}^{-1}$ de CO_2 . UARK, Fayetteville/AR/EUA, 2016. 134

Lista de Tabelas

Table 1- Primers used as reference and target primer for RTqPCR, in rice, weedy rice, and barnyardgrass plants in response to stress caused by drought. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2015.	36
Table 2 - Photosynthesis rate (A), substomatal concentration CO_2 (C_i), stomatal conductance (g_s), transpiration (E), carboxylation efficiency (CE), and intrinsic water use efficiency (iWUE) in rice, weedy rice, and barnyardgrass with or without water deficit, at 3 days after the treatment. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2015.	38
Table 3 - Substomatal concentration CO_2 (C_i), stomatal conductance (g_s), transpiration (E), and carboxylation efficiency (CE) in rice, weedy rice, and barnyardgrass with or without water deficit, 5 days after treatment. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2015.	39
Table 4 - Photosynthesis rate (A) and intrinsic water-use efficiency (iWUE) in rice, weedy rice, and barnyardgrass after 5 days of treatment. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2015.	41
Table 5 - Photosynthesis rate (A) and intrinsic water use efficiency (iWUE) in plants with and without water deficit at 5 days after treatment. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2015.	41
Table 6 - Root dry matter in rice, weedy rice, and barnyardgrass at 3 days of treatment. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2015.	42
Table 7 - Root dry matter average between rice, weedy rice and barnyardgrass plants without or with water deficit at 3 days after treatment. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2015.	42
Table 8 - Root dry matter in rice, weedy rice, and barnyardgrass with or without water deficit at 5 days of treatment. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2015.	42
Table 9 - Protein quantification, activity of the enzymes catalase (CAT) and ascorbate peroxidase (APX), chlorophyll a (Ch _a), b (Ch _b), total (Ch _{tot}), and carotenoid (CR) in rice, weedy rice, and barnyardgrass at 3 days of treatment. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS.	43

Table 10 - Quantification the thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and chlorophyll b (Chb) average between rice, weedy rice, and barnyardgrass plants with or without water deficit 3 days of treatment. FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2015.....	44
Table 11 - Quantification of the protein, hydrogen peroxide (H ₂ O ₂), and thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) in rice, weedy rice, and barnyardgrass with or without water deficit at 5 days of the treatment. FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2015.....	45
Table 12 - Activity the enzymes catalase (CAT), ascorbate peroxide (APX), superoxide dismutase (SOD) and proline, chlorophyll a (Cha), b (Chb), total (Chtot), and carotenoid (CR) in rice, weedy rice, and barnyardgrass at 5 days of treatment. FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS. 2015.....	47
Table 13 - Quantification of the proline and carotenoid (CR) levels in plant with or without water deficit at 5 days of treatment. FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2015.....	48
Table 14 - Pearson's correlation between the variables photosynthesis rate (A), stomatal conductance (gs), substomatal concentration CO ₂ (Ci), transpiration (E), carboxylation efficiency (CE), intrinsic water-use efficiency (iWUE), root dry matter (RDM), protein (Prot), activity of enzymes catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), ascorbate peroxide (APX), hydrogen peroxide (H ₂ O ₂), thiobarbituric acid reactive substance (TBARS), proline (Prol), chlorophyll a (Cha), b (Chb), total (Chtot), and carotenoids (CR) in rice, weedy rice, and barnyardgrass with and without water deficit at 3 days of treatment. FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2015.	49
Table 15 - Pearson's correlation between the variables Photosynthesis rate (A), stomatal conductance (gs), substomatal concentration CO ₂ (Ci), transpiration (E), carboxylation efficiency (CE), intrinsic water-use efficiency (iWUE), root dry matter (RDM), protein (Prot), activity of enzymes catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), ascorbate peroxide (APX), hydrogen peroxide (H ₂ O ₂), thiobarbituric acid reactive substance (TBARS), proline (Prol), chlorophyll a (Cha), b (Chb), total (Chtot), and carotenoids (CR) in rice, weedy rice, and barnyardgrass with and without water deficit at 5 days of treatment. FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2015.	50
Table 16 - Overall average (X), standard deviation (SD), and coefficient variation (CV) of different candidate reference genes 18SrRNA (<i>Os18S</i>), initiation factor 4α eukaryotes (<i>OsElf-4a</i>), β-Tubulin (<i>Osβ-Tub</i>), ubiquitin-conjugating enzyme E2 (<i>OsUBC-E2</i>), and ubiquitin 10 (<i>OsUBQ10</i>) for rice, weedy rice, and barnyardgrass. FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2015.....	52
Tabela 17 - Primes utilizados para RT-qPCR em arroz, arroz-vermelho e capim-arroz submetidos a temperaturas de 25°C e 40°. FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2014.	71

Tabela 18 - Fotossíntese líquida (<i>A</i>), concentração de CO ₂ subestomática (<i>C_i</i>), eficiência da carboxilação (<i>EC</i>), eficiência do uso de água (<i>EUA</i>) de plantas de arroz, arroz-vermelho e capim-arroz expostas a 24 horas de tratamento. FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2014.....	72
Tabela 19 - Fotossíntese líquida (<i>A</i>), condutância estomática (<i>g_s</i>) concentração de CO ₂ subestomática (<i>C_i</i>), eficiência da carboxilação (<i>EC</i>) e eficiência do uso de água (<i>EUA</i>) de plantas de arroz, arroz-vermelho e capim-arroz submetidas a temperaturas de 25°C e 40°C as 28 horas de tratamento. FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2014.	73
Tabela 20 - Média da Evapotranspiração (<i>E</i>) e eficiência de carboxilação (<i>EC</i>) em plantas de arroz, arroz-vermelho e capim-arroz submetidas a temperaturas de 25°C e 40°C as 28 horas de tratamento. FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2014.	74
Tabela 21 - Evapotranspiração (<i>E</i>) e eficiência de carboxilação (<i>EC</i>) em plantas de arroz, arroz-vermelho e capim-arroz expostas a 28 horas de tratamento. FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2014.	74
Tabela 22 - Fotossíntese líquida (<i>A</i>), condutância estomática (<i>g_s</i>) concentração de CO ₂ subestomática (<i>C_i</i>), evapotranspiração (<i>E</i>), eficiência da carboxilação (<i>EC</i>) e eficiência do uso de água (<i>EUA</i>) em plantas de arroz, arroz-vermelho e capim-arroz submetidas a temperaturas de 25°C e 40°C as 32 horas de tratamento. FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2014.	75
Tabela 23 - Condutância estomática (<i>g_s</i>) e evapotranspiração (<i>E</i>) em plantas de arroz, arroz-vermelho e capim-arroz submetidas a temperaturas de 25°C e 40°C as 36 horas de tratamento. FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2014....	76
Tabela 24 - Fotossíntese líquida (<i>A</i>), concentração de CO ₂ subestomática (<i>C_i</i>), eficiência da carboxilação (<i>EC</i>) e eficiência do uso de água (<i>EUA</i>) em plantas de arroz, arroz-vermelho e capim-arroz as 36 horas de tratamento. FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2014.	76
Tabela 25 - Teor de proteína totais, atividade das enzimas catalase (<i>CAT</i>) e ascorbato peroxidase (<i>APX</i>), teor de peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂), espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (<i>TBARS</i>), clorofila a (<i>Cha</i>), clorofila b (<i>Chb</i>) e clorofilas totais e carotenoides (<i>CR</i>) em plantas de arroz, arroz-vermelho e capim-arroz as 24 horas de tratamento. FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2014.	79
Tabela 26 - Teor de proteína totais, atividade das enzimas superóxido dismutase (<i>SOD</i>), catalase (<i>CAT</i>), ascorbato peroxidase (<i>APX</i>), teor de peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂), espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (<i>TBARS</i>), clorofila a (<i>Cha</i>), clorofila b (<i>Chb</i>) e clorofilas totais em plantas de arroz, arroz-vermelho e capim-arroz submetidas a temperaturas de 25°C e 40°C as 28 horas de tratamento. FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2014.	80

Tabela 27 - Teor de proteínas totais, atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX), peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂) e teor de clorofilas b (Chb) em plantas de arroz, arroz-vermelho e capim-arroz submetidas a temperaturas de 25°C e 40°C as 32 horas de tratamento. FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2014.	82
Tabela 28 - Média da Concentração de clorofila a (Cha) e clorofila totais (Chtot) em plantas de arroz, arroz-vermelho e capim-arroz submetidas a temperaturas de 25°C e 40°C as 32 horas de tratamento. FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2014.	83
Tabela 29 - Atividade da enzima catalase (CAT), espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), prolina, clorofila a (Cha) e clorofilas totais (Chtot) em plantas de arroz, arroz-vermelho e capim-arroz as 32 horas de estresse. FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2014.	83
Tabela 30 - Teor de proteínas totais, clorofila a (Cha), clorofila b (Chb), clorofilas totais (Chtot) e carotenoides (CR) em plantas de arroz, arroz-vermelho e capim-arroz submetidas a temperaturas de 25°C e 40°C as 36 horas de tratamento. FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2014.....	84
Tabela 31 - Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), teor de peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂), espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e prolina em plantas de arroz, arroz-vermelho e capim-arroz as 36 horas de tratamento. Capão do Leão/RS, 2014.....	85
Tabela 32 - Correlação de Pearson entre as variáveis taxa fotossintética (A), condutância estomática (gs), concentração subestomática de CO ₂ (Ci), transpiração (E), eficiência de carboxilação (CE), eficiência do uso da água (EUA), teor de proteínas (Prot), atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX), peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂), espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), prolina (Prol), clorofila a (Cha), clorofila b (Chb), clorofilas totais (Chtot) e carotenoides na média em plantas de arroz, arroz-vermelho e capim-arroz as 24 horas de estresse. FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2014.....	91
Tabela 33 - Correlação de Pearson entre as variáveis taxa fotossintética (A), condutância estomática (gs), concentração subestomática de CO ₂ (Ci), transpiração (E), eficiência de carboxilação (EC), eficiência do uso da água (EUA), teor de proteínas (Prot), atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX), peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂), espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), prolina (Prol), clorofila a (Cha), clorofila b (Chb), clorofilas totais (Chtot) e carotenoides na média em plantas de arroz, arroz-vermelho e capim-arroz as 28 horas de estresse. FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2014.	92

- Tabela 34 - Correlação de Pearson entre as variáveis taxa fotossintética (A), condutância estomática (gs), concentração subestomática de CO₂ (Ci), transpiração (E), eficiência de carboxilação (EC), eficiência do uso da água (EUA), teor de proteínas (Prot), atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX), peróxido de hidrogênio (H₂O₂), espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), prolina (Prol), clorofila a (Cha), clorofila b (Chb), clorofilas totais (Chtot) e carotenoides na média em plantas de arroz, arroz-vermelho e capim-arroz as 28 horas de estresse. FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2014..... 93
- Tabela 35 - Correlação de Pearson entre as variáveis taxa fotossintética (A), condutância estomática (gs), concentração subestomática de CO₂ (Ci), transpiração (E), eficiência de carboxilação (EC), eficiência do uso da água (EUA), teor de proteínas (Prot), atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX), peróxido de hidrogênio (H₂O₂), espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), prolina (Prol), clorofila a (Cha), clorofila b (Chb), clorofilas totais (Chtot) e carotenoides na média em plantas de arroz, arroz-vermelho e capim-arroz as 32 horas de estresse. FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2014. 94
- Tabela 36 - Média geral (X), desvio padrão (σ) e coeficiente de variação (CV) dos genes endógenos RNA ribossômico 18S (*Os18S*), fator de iniciação de eucarioto 4- α (*OsElf-4a*), β -Tubulina (*Os β -Tub*) e ubiquitina-conjugada enzima E2 (*OsUBC-E2*) candidatos a genes referência para arroz, arroz-vermelho e capim-arroz. FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2014..... 96
- Tabela 37 - Fotossíntese líquida (A), condutância estomática (gs), concentração de CO₂ subestomática (Ci), taxa de transpiração (E), eficiência da carboxilação (EC) e eficiência do uso de água (EUA) de plantas de arroz, arroz-vermelho e capim-arroz expostas a luz branca, azul e vermelha. FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2015. 110
- Tabela 38 - Estatura (cm), área foliar (cm² planta⁻¹) e massa seca da parte aérea (mg planta⁻¹) de plantas de arroz, arroz-vermelho e capim-arroz expostas a luz branca, azul e vermelha. FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2015. 113
- Tabela 39 - Teores de clorofila a (Cha), clorofila b (Chb), clorofila totais (Chtot) e carotenoides (CR) em folhas de plantas de arroz, arroz-vermelho e capim-arroz. FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2015..... 115
- Tabela 40 - Correlação de Pearson entre as variáveis taxa fotossintética (A), condutância estomática (gs), concentração subestomática de CO₂ (Ci), transpiração (E), eficiência de carboxilação (CE), eficiência do uso da água (EUA), estatura (Est), área foliar (AF), massa seca da parte aérea (MSPA), clorofila a (Cha), b (Chb), total (Chtot) e carotenoides (CR) na média em arroz, arroz-vermelho e capim-arroz em diferentes qualidades de luz. FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2015. 117

Tabela 41 - Primers utilizados para RT-qPCR dos biótipos de <i>E. colona</i> suscetível e resistente a herbicidas crescendo nas concentrações de 400 e 700 $\mu\text{L L}^{-1}$ de CO_2 , suas respectivas eficiências e temperaturas de Melt (TM). UARK, Fayetteville/AR/EUA, 2016.	123
Tabela 42 - Estatura de plantas de <i>E. colona</i> suscetível e resistente cultivadas nas concentrações de 400 e 700 $\mu\text{L L}^{-1}$ de CO_2 . UARK, Fayetteville/AR/EUA, 2016.	125

Sumário

1 INTRODUÇÃO.....	18
2 CAPÍTULO I – Photosynthetic, biochemical, and molecular effects on rice, weedy rice, and barnyardgrass in response to drought.....	30
2.1 Introduction.....	30
2.2 Materials and Methods.....	32
2.3 Results and Discussion.....	37
2.4 Conclusions.....	61
3 CAPÍTULO II – Respostas fisiológicas, bioquímicas e moleculares em arroz, arroz-vermelho e capim-arroz expostos a temperaturas supra ótimas.	62
3.1 Introdução.....	62
3.2 Material e Métodos	65
3.3 Resultados e Discussão	72
3.4 Conclusões.....	104
4 CAPÍTULO III – Interferência da qualidade de luz no desenvolvimento de plantas de arroz, arroz-vermelho e capim-arroz.....	105
4.1 Introdução.....	105
4.2 Material e Métodos	107
4.3 Resultados e Discussão	109
4.4 Conclusões.....	118
5 CAPÍTULO IV – Impacto do aumento de CO ₂ no custo de adaptação de Echinochloa colona com resistência múltipla a herbicidas.....	119
5.1 Introdução.....	119
5.2 Material e Métodos	120
5.3 Resultados e Discussão	124
5.4 Conclusões.....	137
6 CONCLUSÕES.....	138
7 REFERÊNCIAS.....	139
VITA.....	166

1 INTRODUÇÃO

O arroz é uma Liliopsida, com rota fotossintética C3, pertencente à família Poaceae e gênero *Oryza*, o qual possui cerca de 20 espécies conhecidas (KISSMANN, 1999). A espécie *Oryza sativa* L. é a principal do gênero, a qual pertencem à maioria das cultivares de arroz utilizadas no mundo, sendo seu centro de origem o continente asiático. O Brasil está entre os dez maiores produtores mundiais do grão e produziu, na última década, aproximadamente 11,7 milhões de toneladas por ano, sendo o estado do Rio Grande do Sul o maior produtor nacional, com produção de 7,9 milhões de toneladas por ano (CONAB, 2017). Apesar da posição de destaque no cenário orizícola, a produtividade permanece abaixo do potencial produtivo da cultura, isso acontece principalmente devido a estresses bióticos e abióticos.

Dentre os estresses bióticos, destacam-se as plantas daninhas, podendo causar redução de até 90% da produtividade na ausência de controle apropriado (ANDRES; MACHADO, 2004). As duas principais plantas daninhas da cultura do arroz são o arroz-vermelho e o capim-arroz que, por serem da mesma família botânica da cultura, competem pelos mesmos recursos do nicho (RADOSEVICH; HOLT; GHERSA, 2007).

O arroz-vermelho (*Oryza spp.*) é uma planta C3, sendo considerado em muitas condições a principal planta daninha do arroz (GEALY; AGRAMA; JIA, 2012), por pertencer ao mesmo gênero da cultura (VAUGHAN et al., 2001). Estudos apontam que nos Estados Unidos a redução da produtividade do arroz devido à presença de arroz-vermelho pode chegar a 35% (DELOUCHE et al., 2007); enquanto, no Brasil, resultados mostram que a competição da cultura com a planta daninha pode causar

prejuízos diretos de 20% (MARCHESAN et al., 2004), sendo que os danos variam em função da população da planta daninha e da habilidade competitiva do genótipo de arroz cultivado (ESTORNINOS Jr. et al., 2005).

O capim-arroz (*Echinochloa* spp.) ocorre com grande frequência e distribuição em todas as regiões orizícolas e é uma das principais plantas daninhas que infestam lavouras irrigadas no Sul do Brasil (ANDRES et al., 2007). Esta planta daninha é altamente competitiva com arroz, devido à sua adaptação a ambientes alagados, grande produção de sementes, crescimento rápido e mecanismo fotossintético C4 (MARAMBE; AMARASINGLE, 2002), podendo causar perdas de até 90% na produtividade do arroz, dependendo da população da infestante, cultivar e manejo da irrigação da lavoura (PINTO et al., 2008). Mais de 80% das plantas daninhas que infestam as áreas orizícolas brasileiras, pertencem ao gênero *Echinochloa* (KISSMANN, 1999).

A resistência a diferentes herbicidas torna o capim-arroz problemático em diferentes sistemas de cultivo (RAO et al., 2007; VALVERDE, 2007). *E. colona* está entre as espécies daninhas mais dominantes nas lavouras de arroz no mundo (RAMACHANDRA et al., 2012) e pode servir de hospedeira alternativa de doenças, insetos e nematóides (HOLM et al., 2013). Nos EUA, há relato de biótipo de *E. colona* com resistência múltipla a imazethapir, propanil e quincloraque no estado do Arkansas (HEAP, 2017).

A cultura e as plantas daninhas têm sua morfologia, fisiologia, metabolismo e expressão de genes modificadas por estresses abióticos (WAHID et al., 2007). Cada espécie responde de forma distinta aos estresses ambientais, devido a características morfológicas, fisiológicas e história evolutiva das espécies.

Devido às previsões de mudanças no clima, muitos estudos vêm sendo realizados com objetivo de prever o efeito de estresses abióticos sobre o arroz (FELLER; VASEVA, 2014; GOUFO et al., 2014; KAISER et al., 2015). Desde o início da revolução industrial, o dióxido de carbono atmosférico (CO₂) aumentou de 270 para 400 $\mu\text{L L}^{-1}$, e as temperaturas globais médias subiram 0,85°C, com efeitos mais pronunciado nos polos (IPCC, 2017). Além desse fato, observou-se que as últimas três décadas foram as mais quentes em 1400 anos (PAGES, 2013). No final deste século, especula-se que o [CO₂] atinja pelo menos 700 $\mu\text{L L}^{-1}$ e as temperaturas globais deverão aumentar 4°C ou mais (IPCC, 2017). Prevê-se também que os regimes de precipitação se desloquem em escala regional e os ciclos hidrológicos se

intensifiquem, resultando em extremos de condições de seca e alagamentos (MEDVIGY; BEAULIEU, 2012); além disso, podem acontecer mudanças na qualidade de luz incidente sobre as plantas (BERGSTRAND et al., 2016). Essas mudanças já estão tendo impactos profundos no funcionamento fisiológico das plantas, na interação entre plantas e na interação de plantas com outros organismos, ou seja, no ecossistema como um todo (BECKLIN et al., 2016).

Aproximadamente 53% das regiões produtoras de arroz sofrem influência das mudanças climáticas (RAY et al., 2015). O aumento dos eventos de temperatura extrema e redução nas precipitações afeta a agricultura e a produção agrícola (HATFIELD et al., 2011). Os estresses por seca e alta temperatura prejudicam severamente a produção de arroz, atingindo mundialmente, aproximadamente, 23 milhões de hectares (SERRAJ et al., 2011).

O déficit hídrico e a alta temperatura causam alterações fisiológica nas plantas, principalmente na fotossíntese (SUZUKI et al., 2014). Sob condição de déficit hídrico, o fechamento estomático impõe limitações a fotossíntese ao diminuir a disponibilidade de CO₂ (CHAVES; MAROCO; PEREIRA, 2003). Por outro lado, o estresse térmico inibe a fotossíntese, principalmente por causar alterações não estomáticas, como redução da capacidade da cadeia de transporte de elétrons e da atividade da Rubisco (WAY; OREN, 2010). Essas alterações podem diferir entre espécies, principalmente entre plantas com rota fotossintética C3 e C4, sendo as plantas C3 mais sensíveis à seca e à alta temperatura (ALFONSO; BRUGGENANN, 2012), pois as enzimas envolvidas na fotossíntese de plantas C4 são mais tolerantes ao déficit hídrico e à alta temperatura (JALEEL et al., 2009).

O crescimento e o desenvolvimento das plantas, além de serem influenciados pelo déficit hídrico e por temperaturas supra ótimas, sofrem modificações devido à qualidade de luz incidente sobre as plantas. A luz é um recurso crítico para os vegetais e pode limitar seu crescimento e reprodução, desses, pois tem efeito direto sobre a fotossíntese (TAIZ; ZEIGER, 2013). Contudo, a radiação não é somente fonte de energia para as plantas, mas também estímulo que governa e condiciona o desenvolvimento e pode atuar como fator estressante (KANG et al., 2013). Esses efeitos ocorrem por meio da absorção dos fótons de luz, a qual é mediada por fotorreceptores específicos (LARCHER, 2004).

A fração visível da energia solar que contém a radiação fotossinteticamente ativa, está compreendida na faixa espectral de 400-700 nm e tem importância em

vários processos fisiológicos que ocorrem nas plantas, sendo que 45% da radiação proveniente do sol se encontra dentro dessa faixa espectral (LARCHER, 2004). O desenvolvimento e a fisiologia das plantas são fortemente influenciados pelo espectro luminoso do ambiente. Luz com espectro no comprimento de onda do azul (440-476 nm), está envolvida em ampla gama de processos vegetais, como fototropismo, morfogênese, abertura estomática e processos fotossintéticos (WHITELAM, G.; HALLIDAY, 2007). A luz no comprimento de onda do vermelho (600 a 700 nm), está próximo da absorbância máxima da clorofila e dos fitocromos, sendo o componente básico do espectro de luz para a fotossíntese e o crescimento das plantas (KANG et al., 2013). Estudos apontam que o uso de luzes vermelhas ou azuis tem efeito positivo no crescimento de plantas de alface e repolho (LI et al., 2012; MIZUNO; AMAKI; WATANABE, 2011).

Compreender a respostas das plantas e seu potencial evolutivo em nível fisiológico é desafio fundamental para melhorar as previsões da adaptação das culturas e plantas daninhas às alterações climáticas. Por exemplo, o aumento de CO₂ atmosférico altera a taxa fotossintética das plantas, o que leva a mudanças na taxa de crescimento, na produtividade e no uso dos recursos (MEDEIROS; WARD, 2013). Outra resposta fisiológica nas plantas quando submetidas a elevação de [CO₂] é o aumento de açúcares foliares, o que pode influenciar em características importante como tempo para a floração e adaptabilidade a diferentes ambientes (SPRINGER et al., 2008; WAHL et al., 2013). Em escala mais amplas, essas mudanças fisiológicas podem influenciar a sobrevivência de plântulas, o crescimento e a capacidade competitiva (KIMBALL et al., 2012). Sabe-se que mudanças na fisiologia devido à maior [CO₂] modificam o crescimento e o desenvolvimento das plantas, porém pouco se sabe dos efeitos da [CO₂] sobre biótipos de plantas daninhas suscetíveis e resistentes a herbicidas.

Plantas resistentes podem ter menor adaptabilidade ao ambiente mesmo na ausência da aplicação do herbicida, decorrente do efeito pleiotrópico negativo dos alelos de resistência sobre suas características competitivas e/ou reprodutivas (VILA-AIUB; GUNDEL; PRESTON, 2015). A resistência a herbicidas pode ocasionar impactos negativos, positivos ou neutros na população de plantas (HOLT; THILL, 1994), sendo esses influenciados pelo ambiente e pela variação genética. O custo de adaptabilidade associado à resistência pode ser explicado por pelo menos, três mecanismos: 1) mutações no local de ação que conduzem à produção de proteínas

tóxicas ou redução na eficiência da enzima alvo, diminuindo as funções normais da planta; 2) gasto de energia na replicação de um gene extra; e, 3) efeitos pleiotrópicos causados por interações ecológicas negativas (PURRINGTON; BERGELSON, 1997, VILA-AIUB; GUNDEL; PRESTON, 2015).

Exemplos conhecidos de custo de resistência foram observados em *Setaria italica*, *Alopecurus myosuroides* e *Oryza sativa* com resistência a triazina, ACCase e ALS, respectivamente, devido a alterações no local de ação do herbicida (DARMENCY, H.; PERNES, 1989; MENCHARI et al., 2008; SHA; LINScombe; GROTH, 2007), além de plantas *Lolium rigidum* com resistência múltipla à herbicida, devido à metabolização via P450 (VILA-AIUB et al., 2005).

Quando expostas a diferentes estresses ambientais as plantas apresentam aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). Os EROs causam danos oxidativos a biomoléculas, resultando em grave comprometimento celular (SUZUKI et al., 2012). Embora o aumento da produção de EROs na célula representa ameaça para as biomoléculas celulares, também atuam como moléculas sinalizadoras e ativam genes relacionados a vias de sinalização (DUBEY, 2011).

Para proteção dos danos oxidativos causados pelas EROs, as plantas possuem sistemas antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos (GILL; TUTEJA, 2010). O mais importante mecanismo de detoxificação das EROs inclui a atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX) e catalase (CAT). O balanço entre as atividades da SOD, peroxidases e CAT é crucial para se determinar os níveis basais de radicais $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 . Este balanço, junto com o sequestro de íons metálicos, previne a formação de $OH^{\bullet}$ nas reações de Haber-Weiss e Fenton (MITTLER, 2002; VAN BREUSEGEM et al., 2001).

As SODs são metalo-enzimas consideradas a primeira linha de defesa contra as EROs e que catalisam a dismutação de dois radicais $O_2^{\bullet-}$, gerando H_2O_2 e O_2 . Essas enzimas participam da modulação do nível de H_2O_2 em cloroplastos, mitocôndrias, citosol e peroxissomos (MITTLER, 2002; BHATTACHARJEE, 2010).

Para catalisar a oxidação de H_2O_2 , formado pela SOD, as plantas apresentam as enzimas peroxidases (POX) (KVARATSKHELIA; WINKEL; THORNELEY, 1997). Dentre elas encontra-se a APX, a qual possui função de proteção antioxidativa em plantas. Estas enzimas catalisam a transferência de elétrons ao H_2O_2 , usando diferentes substratos reduzidos como doadores. Em plantas, o mais importante redutor para o H_2O_2 é o ascorbato, sendo que a APX usa duas moléculas de ascorbato

para reduzir o peróxido de hidrogênio à água, com geração concomitante de duas moléculas de monodehidroascorbato (MDHA) (NOCTOR; FOYER, 1998). Além disso, essa enzima possui alta afinidade com o H_2O_2 , com constante de Michaelis-Menten (KM) na ordem de μM , permitindo a eliminação do H_2O_2 mesmo em baixas concentrações (LOCATO et al., 2010; SHARMA et al., 2012).

Outra importante enzima envolvida na eliminação H_2O_2 gerado durante a fotorrespiração e a β -oxidação dos ácidos graxos é a CAT, sendo encontrada nos peroxissomos, glioxissomos e mitocôndrias. Essa enzima é responsável por converter H_2O_2 em H_2O e oxigênio molecular (HELDT; HELDT, 2005; DUBEY, 2011). A atividade da CAT é efetiva, principalmente, em concentrações relativamente altas de H_2O_2 (mM). Por isso, são consideradas indispensáveis para a detoxificação de EROs, especialmente em condições de estresse severo, quando os níveis de H_2O_2 estão maiores (DUBEY, 2011). No entanto, esta enzima é menos sensível que as peroxidases, ou seja, tem menor afinidade pelo H_2O_2 , sendo o estresse muitas vezes insuficiente para sua ativação.

A tolerância de plantas a estresses abiótico é resultado de complexa relação entre as atividades das diferentes enzimas antioxidantes (XU et al., 2013). A superexpressão de genes que codificam para as enzimas antioxidantes, aumenta a tolerância de arroz ao déficit hídrico (WANG et al., 2005). Também em arroz, o déficit hídrico estimula a atividade da enzima APX (SELOTE; KHANNA-CHOPRA, 2004); SOD (SHARMA et al., 2012); e CAT (SHEHAB; AHMED; EL-BELTAGI, 2010).

No sistema antioxidante não enzimático está incluído principalmente o grupo dos compostos fenólicos, que são sintetizados pelas plantas em resposta à injúria física, à infecção por bactéria, fungo, nematóides, vírus ou qualquer outro tipo de estresse (NICHOLSON; HAMMERSCHMIDT, 1992). Antioxidantes não enzimáticos são encontrados em todos os compartimentos celulares e os mais importantes são o ácido ascórbico (vitamina C) e a glutatona (GSH), os quais têm propriedades hidrofílicas (CHAUDIÈRE; FERRARI-ILIOU, 2010). Antioxidantes hidrofóbicos são encontrados em lipoproteínas e membranas onde interrompem a propagação da peroxidação lipídica, eliminando radicais peroxil, e bloqueiam a formação de hidroperóxidos a partir do 1O_2 . Dentre estes se destacam a vitamina E, a prolina e os carotenoides (LEDFOORD; NIYOGI, 2005).

A prolina é um aminoácido que atua na proteção de células vegetais contra estresses ambientais. Trata-se de um osmólito, desintoxicador de radicais, dreno de

elétrons, estabilizador de macromoléculas e componente da parede celular (MATYSIK et al., 2002). Este aminoácido é sintetizado a partir de glutamato em três reações exergônicas, consumindo 1 ATP e 2 NADPH (HELDT, 1997). Muitas plantas acumulam prolina em condições de déficit hídrico, salinidade, temperaturas extremas e alguns outros estresses ambientais (CHEN et al., 2001; FUKAYAMA et al., 2011; SCHAT; SHARMA; VOOIJS, 1997).

O metabolismo da prolina está envolvido na regulação do potencial redox intracelular e no armazenamento e na transferência de energia e poder redutor (SHARMA; VILLAMOR; VERSLUES, 2011; GIBERTI; FUNCK; FORLANI, 2014). A biossíntese da prolina ocorre no citoplasma das células vegetais, mas é possível que a produção se desloque para cloroplastos sobre condições de estresse (SZÉKELY et al., 2008).

Os sistemas antioxidantes previnem danos ao aparato fotossintético, atuando entre outras funções na proteção dos pigmentos fotossintetizantes. As clorofilas (a e b) e os carotenoides, localizados nos cloroplastos, são os pigmentos fotossintéticos mais abundantes existentes no planeta. Por sua estrutura química ser instável, as clorofilas são facilmente degradadas, sendo que danos às clorofilas conduzem à disfunção celular, lesões necróticas ou, ainda, à morte celular (FOYER; NOCTOR, 2009; SHARMA et al., 2012).

Os carotenoides constituem outro grande grupo de antioxidantes hidrofóbicos, que se caracterizam por serem constituídos de longas cadeias de hidrocarbonetos com duplas ligações conjugadas (KRINSKY, 1989). Isso permite a ancoragem dessas nas membranas fosfolipídicas, além de possibilitar deslocamento de elétrons desemparelhados e atuar como doadora de elétrons monovalentes. Essa mesma estrutura é responsável pela drenagem da energia de ativação do $^1\text{O}_2$ (KIM et al., 2013; LEDFORD; NIYOGI, 2005). Sendo assim, decréscimo na biossíntese de carotenoides pode resultar em danos às plantas (HAVAUX; NIYOGI, 1999).

Em resposta a diferentes estresses abióticos as plantas passam por reprogramação celular com alteração na expressão e no acúmulo de transcritos de muitos genes (HASHIGUCHI; AHSAN; KOMATSU, 2010; KAVAR et al., 2007). A expressão gênica pode ser desencadeada diretamente pelas condições de estresse ou resultar de danos secundários, como aumento da concentração de EROs nos tecidos celulares (CATTIVELLI et al., 2008). Está bem estabelecido que as respostas das plantas aos estresses por seca, alta temperatura e aumento da $[\text{CO}_2]$ são

processos complexos envolvendo a ação concentrada de muitos genes (FAROOQ et al., 2009).

Análise de expressão gênica é essencial para compreensão de muitos aspectos da biologia vegetal. A reação em cadeia da polimerase da transcrição reversa em tempo real (RT-qPCR) é atualmente uma das técnicas mais poderosas e sensíveis para análise de expressão gênica e contribui para melhorar substancialmente a compreensão da sinalização, do desenvolvimento de vias metabólicas e de processos celulares (PAOLACCI et al., 2009).

A quantificação confiável por análise de RT-qPCR dos níveis de expressão de genes requer a normalização e o ajuste de vários parâmetros, tais como: quantidade de amostra inicial; integridade do RNA; eficiência enzimática de síntese de cDNA e amplificação por PCR; e atividade de transcrição de tecidos ou células analisadas (GUTIERREZ et al., 2008). Para a normalização, a utilização de genes de controle interno (genes de referência) é o método mais confiável e conveniente para estimar a quantidade de RNA inicial (THELLIN et al., 1999), bem como para reduzir possíveis erros gerados na quantificação da expressão do gene, a qual é obtida através da comparação dos níveis de expressão em amostras analisadas do gene de interesse e de genes constitutivos de controle estável (PAOLACCI et al., 2009).

É provável que um ou mais genes são expressos de forma constitutiva em órgão específico e em ambiente específico (ANDERSEN; JENSEN; ORNTTOFT, 2004). Deste modo, a seleção e a validação sistemática de genes de referência devem ser realizadas preliminarmente a todas as análises de RT-qPCR (GUTIERREZ et al., 2008). Alguns genes, em decorrência de seus papéis no processo celular básico, metabolismo primário e na manutenção da estrutura celular, são muitas vezes designados como genes de referência (CZECHOWSKI et al., 2005; WONG; MEDRANO, 2005).

A expressão dos genes *APX* é modulada por vários estímulos ambientais, conhecidos por aumentar a produção de EROs, tais como seca, alta intensidade de luz, alta temperatura, estresse salino, bem como ataque de patógenos (MITTLER, 2002; SHIGEOKA et al., 2002). As enzimas *APX* são codificadas por uma família multigênica, sendo que em arroz foram descritas oito isoformas: duas no citosol (*OsAPX1* e *OsAPX2*), duas nos peroxissomos (*OsAPX3* e *OsAPX4*) e quatro nos cloroplastos (*OsAPX5*, *OsAPX6*, *OsAPX7* e *OsAPX8*). A localização subcelular

distinta permite a regulação dos níveis de EROs em compartimentos celulares diferentes para fins de sinalização ou de defesa (TEIXEIRA et al., 2004).

Em angiospermas, as isoformas citoplasmáticas de APX são fortemente moduladas por diferentes estresses (TEIXEIRA et al., 2006). Em arroz, os genes *APX* citoplasmáticos foram regulados positivamente pelo aumento de concentração celular de ácido salicílico, etileno, H_2O_2 , ácido abscísico, sulfato de cobre e ácido jasmônico, sugerindo que as isoformas citoplasmáticas de APX podem desempenhar papel protetor contra condições estressantes (AGRAWAL et al., 2003). Além disso, temperaturas elevadas e déficit hídrico estimularam a expressão de *APX* citoplasmáticas em arroz e espinafre (ROSA et al., 2010; YOSHIMURA et al., 2000).

A SOD, como citado anteriormente, é uma enzima antioxidante presente em diversos compartimentos celulares e representam a primeira linha de defesa das plantas contra as EROs (NOCTOR; LELARGE-TROUVERIE; MHAMDI, 2015). São classificadas de acordo com seus cofatores metálicos: cobre e zinco (Cu/Zn-SOD), manganês (Mn-SOD) e ferro (Fe-SOD) (GILL; TUJETA, 2010), sendo a Cu/Zn encontrada do citosol, cloroplasto e peroxissomos. Transformações de plantas de batata e fumo para superexpressar o gene *Cu/ZnSOD* aumentou a tolerância destas culturas a diferentes estresses ambientais (PERL et al., 1993; SEN-GUPTA et al., 1993)

A seca e a alta temperatura envolvem, como características comum, o aumento de proteínas inativas, desnaturadas, agregadas ou oxidadas. A homeostase proteica sob estresse é mantida através de diferentes mecanismos bioquímicos que regulam a biossíntese, o dobramento, o transporte e a degradação de proteínas (CHEN et al., 2011). A proteção contra degradação de proteínas em plantas acontece através da síntese de proteínas protetoras, tais como as HSPs (*heat-shock protein*) (VASEVA; ANDERS; FELLER, 2014).

As HSPs têm função essencial na homeostase das proteínas em condições normais e são altamente sensíveis a vários estresses (WANG et al., 2005). Seu papel fisiológico essencial é manter a conformação e evitar a agregação proteica, porém participam também do redobramento de proteínas desnaturadas para sua conformação correta e na remoção de polipeptídios não funcionais e potencialmente nocivos (FELLER; VASEVA, 2014). As HSPs de plantas compreendem cinco classes de acordo com o seu peso molecular aproximado: HSP100, HSP90, HSP70, HSP60 e *small heat-shock protein* (sHSPs) (KOTAK et al., 2007). Trabalhos realizados com

diferentes espécies demonstram o aumento da expressão de diferentes genes *HSPs* quando as plantas foram submetidas a déficit hídrico e a aumento de temperatura (GRIGOROVA et al., 2011; YE et al.; 2012).

A enzima ribulose 1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase (Rubisco) desempenha papel central na fotossíntese, sendo que a taxa de assimilação de CO₂ está diretamente relacionada à quantidade total de Rubisco durante a vida da folha (MAKINO; MAE; OJIMA, 1985). O teor de Rubisco aumenta rapidamente durante a expansão foliar, atinge seu máximo em torno da maturação e, em seguida, diminui gradualmente durante a senescência, sendo os produtos da degradação são utilizados como fonte de nitrogênio para tecidos em desenvolvimento (SUZUKI; MAKINO; MAE, 2001). Alterações na quantidade de Rubisco estão, portanto, diretamente relacionadas à assimilação de carbono e à economia de nitrogênio na planta.

Em plantas superiores, a Rubisco é uma proteína formada por oito subunidades pequenas (RBCS) e oito subunidades grandes (RBCL). Sabe-se que as RBCS são codificadas por uma família multigênica, nuclear, que tem de dois a 22 membros, dependendo da espécie (SASANUMA, 2001). A abundância de transcritos da família multigênica RBCS foi examinada em diferentes tecidos e/ou fase de desenvolvimento em várias espécies de plantas, incluindo tomate (SUGITA; GRUISSEM, 1987), *Arabidopsis* (YOON et al., 2001), trigo (GALILI; AVIVI; FELDMAN, 1998) e arroz (SUZUKI et al., 2009). Para todas as plantas examinadas, os transcritos do gene RBCS são altamente acumulados nas folhas, mas suas proporções relativas dentro de uma folha dependem das espécies de plantas. Em algumas espécies, é relatado que a expressão gênica de genes RBCS é regulada diferencialmente por condições ambientais adversas (DEDONDER et al., 1993; SUGITA; GRUISSEM, 1987; YOON et al., 2001).

As enzimas P450 são conhecidas como enzimas-chave na fase I do metabolismo de xenobióticos e possuem papel fundamental na detoxificação de herbicidas em plantas (YUN et al., 2005). Essas enzimas estão envolvidas na rápida evolução da resistência de biótipos de azevém (*Lolium rigidum*) (BUSI et al., 2013). Em *Echinochloa phyllopogon* foi verificada maior expressão dos genes *CYP81A12* e *CYP81A21* em plantas resistentes aos herbicidas bensulfuron-metil e penoxulam (IWAKAMI et al., 2014). Em *Echinichloa crus-galli*, o gene *CYP81A6* apresentou maior expressão em plantas resistentes ao herbicida imazethapir (DALAZEN et al., 2015).

As glutathionas S-transferases (GSTs) são enzimas que atuam na fase II da detoxificação (EDWARDS et al., 2011). Essas enzimas podem ser induzidas por estresses bióticos ou abióticos, tais como o estresse osmótico e temperaturas elevadas, além de estresses oxidativos, ocasionados por herbicidas (DIXON et al., 2002).

A detoxificação por conjugação com glutathiona (GSH) é observada, principalmente, em herbicidas pertencentes aos grupos das clorotriazinas, difenileters, cloroacetanilidas, sulfoniluréias e ariloxifenoxipropionatos (CUMMINS et al., 2011), sobretudo em Poaceae. Em biótipos de *E. crus-galli* resistentes, após a aspersão do herbicida quincloraque, foi observado aumento de 6-10 vezes no nível de expressão do gene *EcGST1* (LI et al., 2013). Alguns estudos indicam que a resistência de *Alopecurus myosuroides* a vários herbicidas é ocasionada por uma GST codificada pelo gene *AmGSTF1* (CUMMINS et al., 2013).

A expressão diferencial do fator iniciador de tradução *ELF4B* está relacionada com a ocorrência de estresses em plantas, sendo importante na regulação gênica pós-transcricional em eucariotos (SONENBERG; HINNEBUSCH, 2009). Esse fator de iniciação de tradução, juntamente com outras proteínas, é responsável pelo processo de reconhecimento do mRNA pelos ribossomos durante o processo de síntese proteica (SPRIGGS; BUSHELL; WILLIS, 2010). Essa proteína apresenta função helicase, responsável pelo desenrolamento de alguns mRNA na região 5'-UTR e exposição do códon inicial (AUG) para início da tradução nos ribossomos (SHAHBAZIAN et al., 2010). Dessa forma, o aumento da expressão *Elf-4b* pode desencadear o processo de resposta das plantas a mudanças do ambiente, resultando no aumento da expressão de vários outros genes.

As mudanças no clima afetam todas as espécies em vários níveis organizacionais, porém as alterações em cada espécie, ou até mesmo em genótipos dentro da espécie podem ser diferentes frente aos estresses abióticos. As hipóteses do trabalho foram que plantas com via fotossintética C4, como o capim-arroz, comparativamente as plantas com via fotossintética C3, como o arroz e o arroz-vermelho, quando submetidas a déficit hídrico, temperatura subótima e diferente qualidade de luz, tem menores alterações de variáveis morfológicas, fisiológicas, bioquímicas e moleculares; e que, biótipos de *E. colona* com resistência múltipla aos herbicidas quincloraque, propanil, cialofop-butilico e glufosinato de amônio, quando submetidos a alta [CO₂], têm menor adaptabilidade ao ambiente que os biótipos

suscetíveis. Assim, os objetivos da pesquisa foram comparar alterações morfológicas, fisiológicas, bioquímicas e moleculares em plantas de arroz irrigado e plantas daninhas da cultura com via fotossintética C_3 e C_4 , quando estas são submetidas a estresses por déficit hídrico, temperaturas supra ótimas e diferente qualidade de luz; e, avaliar o efeito de níveis de CO_2 em biótipos de *E. colona* com resistência múltipla a herbicidas.

2 CAPÍTULO I – Photosynthetic, biochemical, and molecular effects on rice, weedy rice, and barnyardgrass in response to drought

2.1 Introduction

Global change is characterized by increased carbon dioxide (CO₂) concentration in the atmosphere, increasing average temperatures, and occurrence of frequent extreme events including drought periods (MITTAL et al., 2014; TESKEY et al., 2015). Water is important factor in agriculture and food production, but is a highly-limited resource (WANG; GENG; ZHANG, 2012). Rice is an important staple food of more than 3 billion peoples, comprising of 50–80% of their daily calorie intake. Rice as a paddy field crop is particularly sensitive to water stress (SERRAJ et al., 2011).

Biotic stress along with the presence of weeds affects the growth and development of rice crop. The two main weeds of rice fields in South America are weedy rice and barnyardgrass. Weedy rice is characterized as a genetically diverse population of the *Oryza* spp., with similar morphology to rice, but difference in the timing of seed maturation, amount of seed shattering, seed dormancy, and seed longevity (ZISKA et al., 2015). The barnyardgrass (*Echinochloa* spp.) has over 250 plant species, many are considered as weeds. The morphological, physiological, and biochemical traits of this weed make than a strong competitor in rice fields and other crop fields (CLAY et al., 2005).

The drought stress tolerance is evident in almost all plants, but its extent varies among species and even within species. The degree of drought on plants depend on the impact on plant's physiological, biochemical, and molecular biological processes, as well as the plant ability to adapt under these conditions. The photosynthetic pathway

of plants is directly related to stress due to drought. Rice crop follows the C3 photosynthetic pathway and grows in fields with weeds that follow similar pathway, such as weedy rice and C4 weeds like barnyardgrass.

Water deficit affects plants physiology in several ways such as plant net photosynthesis, transpiration rate, stomatal conductance, water use efficiency, intercellular CO₂, photosystem II activity, and membrane stability index (YANG; HUANG; QIN, 2014; CHA-UM et al., 2010). A common effect of drought stress is the disturbance between the generation and quenching of reactive oxygen species (ROS) (FAIZE et al., 2011). ROS include superoxide radical, hydroxyl free radical, hydrogen peroxide, and singlet oxygen, which leads to a peroxidation of lipids, denaturation of proteins, disruption of cellular homeostasis, and other types of cellular oxidative damage. Plants cells are protected against the detrimental effects of ROS by a complex antioxidant system that comprises of non-enzymatic as well enzymatic antioxidants. The enzymatic antioxidants include superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and ascorbate peroxidase (APX).

Under water deficit, plants accumulate different types of organic and inorganic solutes in the cytosol to lower their osmotic potential in order to maintain cell turgor. Osmotic adjustment is achieved by the accumulation of proline and another solute (MAISURA et al., 2014). Another effect of this is the loss of or reduction in the synthesis of photosynthetic pigments, which results in declined light harvesting and generation of reducing power in long term, which are closely associated to plant biomass and yield (JALEEL et al., 2009).

Drought affects a plant at the molecular level, and more than 5000 genes were identified to be differentially expressed in rice submitted to drought stress (RAY et al., 2011); however, little is known about the effect of drought on the expression of weed genes from that crop. The response to drought stress is a mutigenic trait, and the products of these stress-inducible genes are proteins that directly protect against stress, probably by protecting cell from dehydration and antioxidant stress. Cytosolic APXs are considered to be the most important peroxidases for scavenging and maintaining hydrogen peroxide (H₂O₂) homeostasis in the cytosol (SUZUKI; MAKINO, 2013), these enzymes are strongly responsive to abiotic and biotic stresses (SHIGEOKA; MARUTA, 2014).

For instance, heat shock proteins (HSPs) perform a fundamental role in protecting plants against abiotic stress (AHUJA et al., 2010). HSPs can be classified

into five major types based on their approximate molecular weights. In *Arabidopsis*, HSPs 90 are essential for tolerance to abiotic stress (YAMADA et al., 2007). The HSPs 70 represents one of the most highly conserved classes of HSPs. Other important HSPs family under stress response is the small HSPs (sHSPs); the HSPs that can bind to partially folded or denatured proteins prevents irreversible unfolding or incorrect protein aggregation.

The gene expression studies by RT-qPCR require the knowledge of stably expressed reference genes for data normalization of target genes under specific experimental condition, because the use of inadequate non-validated reference gene may result in doubtful interpretation of the data (BUSTIN et al., 2009; DERVEAUX; VANDERSOMPELE; HELLEMANS, 2010). Therefore, to allow the evaluation of the expression of genes related to stress response in rice, weedy rice, and barnyardgrass, it is of primary importance to determine the most suitable reference genes to normalize the expression data.

Understanding the different physiological, biochemical, and molecular features of rice plants and weeds that culture when subjected to abiotic stresses is important to obtain information to predict how these plants will behave under the expected climate changes in future, and, accordingly, develop management strategies for weeds control in these situations. Thus, the objectives of the present study were to compare the physiological and biochemical responses, identify the most suitable reference gene for transcript normalization, and determinate the expression of genes *OsAPX2*, *OsHSP24.15*, *OsHSP71.10*, and *OsHSP85.88* in rice, weedy rice, and barnyardgrass under drought conditions.

2.2 Materials and Methods

The experiment was conducted in the greenhouse of the Universidade Federal de Pelotas, Capão do Leão city, in October–November 2015. The experiment utilized completely randomized design with four repetitions, with a factorial combination of plants x drought treatments. The two factors studied were (A) plants: rice (*Oryza sativa* CV Puitá), weeding rice (*Oryza* spp.), and barnyardgrass (*Echinochloa* spp.), and (B) water regime with and without water deficit. The plants were sown in trays containing washed sand, and 7 days after the emergence of plants, they were transferred to a hydroponic solution in 4-L pots (12 plants/pot). The hydroponic solution was changed

every 5 days (YOSHIDA, 1981), and drought stress (-0.3 MPa) was imposed 15 days after transplanting (plants with one tillers) by adding polyethylene glycol 6000 (PEG), the osmotic potential was calculated for equation proposal for Michel and Kaufmann (1973): $\Psi_{os} = - (1,18 \times 10^{-2}) C - (1,18 \times 10^{-4}) C^2 + (2,67 \times 10^{-4}) CT + (8,39 \times 10^{-7}) C^2T$ where Ψ_{os} is osmotic potential (bar), C is concentration of PEG in g/ Kg H₂O and T is the temperature in °C.

The photosynthetic evaluation and sampled of leaf and roots were performed at 3 and 5 days after the onset of stress. The leaf materials were stored at -80° until the time of measurement of variables. The roots were removed and dried in an oven using forced air circulation until a constant weight was achieved.

Photosynthetic variables were held using Infra-Red Gas Analyzer-IRGA (LI-6400), including the photosynthesis rate (A), substomatal concentration CO₂ (C_i), stomatal conductance (g_s), and transpiration (E). Next, the intrinsic water effective use (iWUE) and carboxylation efficiency (CE) were calculated using the formulas A/E and A/C_i, respectively. These parameters were measured between 09:00 and 11:00 hours (local time). The CO₂ concentration inside the leaf chamber was set to 400 µmol mol⁻¹, photons flux was 1200 µmol m⁻² s⁻¹ and the vapor pressure deficit (VPD) and leaf temperature were the same as those measured in the surrounding atmosphere of the leaf. The measurements were performed on the youngest, fully expanded leaves of each replicate from the two plants.

To determine the activity of the antioxidant enzymes SOD, APX, and CAT, the protein samples were quantified by the Bradford method. The APX and CAT activities were determined according to the method given by Azevedo et al. (1998), and the methodology for determining SOD was adapted from Giannopolitis and Ries (1977); for these analyzes, 0.2 g of the plant extract was used.

The content of H₂O₂ was determined as described by Sergiev et al. (1997), and the cellular damage to tissues was determined by using thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) via accumulation of malondialdehyde (MDA), as described by Heath and Packer (1968). The proline concentration was determined as per the method of Bates, Waldren and Teare (1973). The chlorophyll a (Ch_a), chlorophyll b (Ch_b), and total chlorophyll (Ch_t) as well as the carotenoid (CR) contents were measured in 0.1 g of the samples and calculated by the formula of Lichtenthaler (1987) [results were expressed in mg g⁻¹ fresh weight (FW)].

For molecular evaluation, the youngest, fully expanded leaves collected 5 days after the treatment was used. The material was stored at -80° until the RNA extraction process; the RNA was extracted from plant leaves using the reagent PureLinkTM (Plant RNA Reagent – InvitrogenTM), followed the manufacturer's recommendations. The cDNA was obtained by using the SuperScript III First-Strand System Kit for RT-qPCR (Invitrogen), according to the manufacturer's recommendation. The quantity and quality were assessed by agarose gel electrophoresis (1% w/v). The amount and purity of RNA were determined on the NanoDropTM 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific), with ratios 260/280 nm in the range of 1.9 to 2.2 and 260/230 nm around 2.0 was considered acceptable for use in RT-qPCR.

Seven primer pairs were selected as reference genes and used as internal control in the RT-qPCR analysis of other studies with rice, which supposedly did not show any variation among the treatments (Table 1). A total volume of 12 μ L containing 6.25 μ L of LightCycler[®] 480 SYBR Green I Master (Roche Applied Science), 0.5 μ L primer (10 mM), 1 μ L cDNA (0.2 μ g), and water (to adjust the final volume) were amplified for one cycle of 95°C (5 min), followed by 45 cycles of denaturation at 95°C (20 s), 60°C (1 min), and 72°C (20 s), and a final dissociation curve of denaturation at 95°C (5 s), followed by cooling to 70°C (1 min) and gradual heating at 0.11°C steps to 95°C and cooling 40°C (30 s) using the LightCycler 480 system (Roche Applied Science). All reactions were performed in triplicate for each cDNA sample. The purity of amplicon produced was assumed when a single melting peak was obtained. The efficiency of PCR was obtained from four serial dilutions of cDNA (1:1, 1:5, 1:25, and 1: 125) to generate a standard curve for each primer pair tested. The E value was estimated by using the equation, $E = 10^{-1/\text{slope}}$ (Table 1).

The classification and determination of the performance of each reference gene was performed with an average Ct values for each sample tested that were obtained by the RT-qPCR reaction cycle. The data obtained were subjected to analysis of variance (ANOVA). Thus, the genes were considered to be stable and normalizing if they presented with lower standard deviation and coefficient of variation. Besides, the average expression stability in culture and weeds was tested using the RefFinder (XIE et al., 2012), which includes four software algorithms—GeNorm, NormFinder, BestKeeper, and e Delta-Ct. The number of reference genes necessary for correct normalization of the experiment was obtained by pairwise variation (V) using the GeNorm algorithm.

The analyzed of target gene expression we used four genes that are recognized to change their expression in plants submitted to water deficit, these were *OsAPX2*, *OsHSP24.15*, *OSHSP71.10*, and *OsHSP85.88* (Table 1). PCR condition were the same as described previously and relative expression data were calculated by using the formula $QR = 2^{-\Delta CT}$.

The data were statistically analyzed by two-way ANOVA ($p \leq 0.05$). The effects of plants were evaluated by Duncan test ($p \leq 0.05$), and the levels of hydric regime were evaluated by t test ($p \leq 0.05$). The correlation between the variables dependent on the study was analyzed using Pearson's correlation coefficient ($p \leq 0.05$), which measures the degree of correlation between two variables.

Table 1- Primers used as reference and target primer for RTqPCR, in rice, weedy rice, and barnyardgrass plants in response to stress caused by drought. FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2015.

Gene	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')	Efficiency		
			Rice	Weedy rice	Barnyardgrass
<i>OsACT11</i> (ZHANG; HU, 2009)	CAGCCACACTGTCCCCATCTA	AGCAAGGTCGAGACGAAGGA	1.80	2.37	2.37
<i>Os β-Tubulina</i> (ZHANG; HU, 2009)	GCTGACCACACCTAGCTTTGG	AGGGAACCTTAGGCAGCATGT	1.82	2.07	2.05
<i>OsUBC-E2</i> (JAIN et al., 2006)	CCGTTTGTAGAGCCATAATTGCA	AGGTTGCCTGAGTCACAGTTAAGTG	1.95	2.11	2.10
<i>OsEIF-4a</i> (JAIN et al., 2006)	TTGTGCTGGATGAAGCTGATG	GGAAGGAGCTGGAAGATATCATAGA	1.92	2.12	2.20
<i>OsUBQ10</i> (JAIN et al., 2006)	ACCACTTCGACCGCCACTACT	ACGCCTAAGCCTGCTGGTT	2.02	2.20	2.18
<i>OsGAPDH</i> (JAIN et al., 2006)	AAGCCAGCATCCTATGATCAGATT	CGTAACCCAGAATACCCTTGAGTTT	1.94	2.46	1.04
<i>Os18SrRNA</i> (JAIN et al., 2006)	CTACGTCCCTGCCCTTTGTACA	GCAACAAGGTCAATCCGATC	1,92	2,06	2.00
<i>OsAPX2</i> (ZHANG; LU; ZHANG, 2014)	AGAGTCAGTACGATCAAGAC	TCTTGACAGCAAATAGCTTGG	2.20	2.20	2.07
<i>OsHsp24.15</i> (YE et al., 2012)	GATCAAGGCGGAGATGAAGAAC	ACTCGACGTTGACCTGGAAGA	2.20	2.17	2.07
<i>OsHsp71.10</i> (YE et al., 2012)	CCGTGTGCTTCGACATTGAC	CGTTGGTGATGGTGATCTTGTT	2.20	2.11	2.15
<i>OsHsp85.88</i> (YE et al., 2012)	ACGGTGACGGAGGTGATTGA	AACAAAGGATGCCCAAGAGAAC	2.20	2.01	2.20

2.3 Results and Discussion

After 3 days of treatment, an interaction was observed between the factors tested for the variables photosynthesis rate (A), substomatal concentration CO_2 (C_i), stomatal conductance (g_s), transpiration (E), carboxylation efficiency (CE), and water use efficiency ($iWUE$) (Table 2). Photosynthesis under stressful environment contributed substantially to the plant growth and development. We observed that A value was higher in barnyardgrass as compared to that in rice and weedy rice under both the water conditions (Table 2). The three plants had reduced A under drought; it was 23% reduced for the rice and weedy rice and around 20% reduced for the barnyardgrass; the C_4 plant maintained the photosynthetic rate at about 44% higher than of the C_3 plants under drought conditions. The photosynthetic rate usually decreases during the exposure of the plant to drought stresses (CHAVES; FLEXAS; PINHEIRO, 2009).

Higher C_i were observed in rice and weedy rice under both the water conditions as compared to that in barnyardgrass, which can be attributed to the lower CO_2 consumption of these plants due to their photosynthetic route (Table 2). The rice reduced by about 30% of C_i when subjected to drought, and weedy rice had a reduction of 40% under this condition. The g_s were lower in rice and weedy rice under drought (43 and 35% reduction, respectively). Furthermore, barnyardgrass did not have a different C_i and g_s under drought during the time of evaluation. The C_i and g_s reduction indicates stomatal closure, and the regulation of leaf g_s is a key phenomenon in plants as it is vital for both prevention of desiccation and CO_2 acquisition. Stomatal closure in response to drought stress generally occurs due to decreased leaf turgor and atmospheric vapor pressure along with root-generated chemical signals, resulting in C_i reduction (CHAVES; FLEXAS; PINHEIRO, 2009).

The plants tested under no water stress condition showed no difference in E , while, water-deficit barnyardgrass had lower E than that of rice and weedy rice; it was approximately 24, 25, and 35% for rice, weedy rice, and barnyardgrass, respectively (Table 2). Stomatal closure has inhibitory effects on transpiration into rice leaf tissues (AKRAM et al., 2013).

Table 2 - Photosynthesis rate (A), substomatal concentration CO₂ (Ci), stomatal conductance (gs), transpiration (E), carboxylation efficiency (CE), and intrinsic water use efficiency (iWUE) in rice, weedy rice, and barnyardgrass with or without water deficit, at 3 days after the treatment. FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2015.

Plants	Rice		Weedy rice		Barnyardgrass	
A (μmol CO ₂ m ⁻² s ⁻¹)						
Without deficit	32.50	* ¹ b ²	27.25	* b	52.10	* a
With deficit	25.02	b	20.97	b	40.93	a
CV(%)	8,17					
Ci						
Without deficit	163.67	* a	170.50	* a	48.50	^{ns} b
With deficit	112.50	a	102.85	a	44.00	b
CV(%)	14.95					
gs (mol H ₂ O m ⁻² s ⁻¹)						
Without deficit	0,23	* a	0,23	* a	0,15	^{ns} b
With deficit	0,16	a	0,17	a	0,12	b
CV(%)	13,96					
E (mmol H ₂ O m ⁻² s ⁻¹)						
Without deficit	6.71	* a	7.61	* a	7.20	* a
With deficit	5.05	a	5.66	a	4.61	b
CV(%)	12.23					
CE (μmol CO ₂ m ⁻² s ⁻¹)						
Without deficit	0.20	^{ns} b	0.27	* b	1.54	^{ns} a
With deficit	0.23	b	0.17	b	1.24	a
CV(%)	17.63					
iWUE (μmol CO ₂ [mmol H ₂ O] ⁻¹)						
Without deficit	4.37	* b	3.66	* b	7.43	^{ns} a
With deficit	4.96	b	4.85	b	7.90	a
CV(%)	5.15					

¹ * or ^{ns} means differs or not between the tested plants without and with water deficit by t test ($p \leq 0.05$).

² Means followed by the same letter in the line do not differ for Duncan test ($p \leq 0.05$).

The CE and iWUE were lower for rice and weedy rice than for barnyardgrass plants, both with and without water deficit. Weedy rice had reduced CE of about 37% under drought condition, while the CE of rice and barnyardgrass did not change under drought. iWUE was increased in C3 tested plants when they were in water deficit condition; however, the iWUE of most C4 plants were not affected by this stress. Several reports showed that stomata usually close during the initial stages of drought stress, resulting in increased iWUE due to decrease in the transpiration rate (AKRAM et al., 2013; CHAVES; FLEXAS; PINHEIRO, 2009).

The data collected in 5 days after the treatment showed interaction between the plant and drought factors for the variables Ci, gs, E, and CE (Table 3). The variables

A and iWUE were isolated effect of plants and hydric condition factors (Table 4 and 5). About C_i , we observed the same form verified in the first evaluation; it was smaller in barnyardgrass than in rice and weedy rice plants under both the water regimes (Table 3). The C_i of rice and weedy rice reduced about 2-folds under water stress, while it did not have any effect on the C_i value of barnyardgrass. The drought caused the stomatal closure, which led to a decrease in the internal concentration of CO_2 , which in turn may have led to electron transfer to O_2 , causing ROS production in plants (RODZIEWICZ et al., 2014).

Table 3 - Substomatal concentration CO_2 (C_i), stomatal conductance (g_s), transpiration (E), and carboxylation efficiency (CE) in rice, weedy rice, and barnyardgrass with or without water deficit, 5 days after treatment. FAEM/UFPEl, Capão do Leão/RS, 2015.

Plants	Rice		Weedy rice		Barnyardgrass	
Ci						
Without deficit	165.75	* ¹ a ²	156.75	* a	38.25	^{ns} b
With deficit	73.30	a	54.97	a	40.33	b
CV(%)	17.36					
gs (mol H ₂ O m ⁻² s ⁻¹)						
Without deficit	0,23	* b	0,28	* a	0,11	^{ns} c
With deficit	0,10	a	0,11	a	0,07	b
CV(%)	16,03					
E (mmol H ₂ O m ⁻² s ⁻¹)						
Without deficit	6,10	* b	7,46	* a	6,40	* b
With deficit	2,10	b	3,80	a	2,81	b
CV(%)	14,27					
CE (μmol CO ₂ m ⁻² s ⁻¹)						
Without deficit	0.18	^{ns} b	0.23	^{ns} b	1.20	^{ns} a
With deficit	0.21	b	0.38	b	0.80	a
CV(%)	33.77					

¹* or ^{ns} means differs or not between the without and with deficit plants by t test ($p \leq 0.05$). ²Means followed by the same letter in the line do not differ for Duncan test ($p \leq 0.05$).

Under no drought stress, weedy rice had the highest g_s , followed by rice and then barnyardgrass had the lowest g_s of three plants while water deficit rice and weedy rice had higher g_s as compared to barnyardgrass (Table 3). Rice and weedy rice had reduced g_s when subjected to water deficit, however, the g_s of barnyardgrass did not change under drought, following the example of what happened in the first evaluation. Therefore, stomatal conductance is the principal factor limiting CO_2 diffusion from the atmosphere to the Rubisco in most cases, and it is responsible for reducing carbon

fluxes and lowering the rates of photosynthesis in plants, and this resistance to CO_2 flux depends on the plant species (ADACHI et al., 2013).

Stomatal control is an important property by which a plant can limit its water loss, which affects gas exchange. This feature may be influenced by several factors including stress by water deficit; under both the water conditions, weedy rice had the highest E value. The three plants had reduced E under water stress, with rice having about 3-fold reduced E value and weeds having 2-fold reduced value (Table 3).

As expected, to be a C4 plant, the CE was higher in barnyardgrass than in the other plants tested under both the water conditions. None of the tested plants changed the CE when subjected to water deficit during the period of evaluation. The CE increased despite the reduction in the photosynthesis rate, with even greater reduction in C_i observed due to stomatal closure; these results imply that the rubisco continued to perform carbon fixation, because otherwise CO_2 would accumulate in the substomatic cavity.

At 5 days, after subjecting to stress, the A value and iWUE was higher in barnyardgrass than in rice and weedy rice (Table 4). The A value was about 40% lower and the iWUE about 100% lower in C3 plants. Generally, C4 plants such as barnyardgrass are best adapted to arid environments due to their high iWUE as compared to C3 plants.

The C4 plants have higher photosynthetic efficiency than C3 plants, because they process an additional carbon fixation pathway, and their characteristic anatomy limits photorespiration, that is in C4 cycle instead of rubisco, the enzyme phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPcase) catalyze the primary carboxylation in tissues close the external atmosphere. The 4-carbons component resulting flows into the vascular region where it is decarboxylated, releasing CO_2 , and that is refixed by rubisco for C3 cycle. This process reduces the photorespiration make the CO_2 concentration higher close to the rubisco active site. The photorespiration process results in a loss of up to 50% of carbon fixation owing to competition of O_2 with CO_2 at the catalytic site of rubisco (OGREN, 1984).

The decrease in the photosynthesis rate under stressful condition can be attributed directly to the suppression in the mesophyll conductance and the stomatal closure under moderate and severe stress (CHAVES; FLEXAS; PINHEIRO, 2009). The plants when subjected to stress by water deficiency reduced their photosynthesis

rate by 30% (Table 5); this value is very close to that reported by Akram et al. (2013) for 3 different rice genotypes.

Table 4 - Photosynthesis rate (A) and intrinsic water-use efficiency (iWUE) in rice, weedy rice, and barnyardgrass after 5 days of treatment. FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2015.

Plants	A $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$	iWUE $\mu\text{mol CO}_2 [\text{mmol H}_2\text{O}]^{-1}$
Rice	22.44 b ¹	4.70 b
Weedy rice	29.24 b	4.26 b
Barnyardgrass	42.37 a	10.25 a
CV(%)	29.28	8.49

¹Means followed by the same letter in the column do not differ for Duncan test ($p \leq 0.05$).

The results obtained showed that plants remain in moderate stress until 5 days of applying water stress, because, in these situations, the stomata closes and the iWUE tends to remain the same or even increase as this process inhibits more E than reduced CO_2 assimilation (FELLER, 2016). When stress becomes severe, however, dehydration of mesophyll cells inhibits the photosynthesis metabolism and the iWUE decreases. Results from studies in different plants have shown that the relative effect of water stress on stomatal conductance is significantly greater than on photosynthesis (AKRAM et al. 2013; CHAVES; FLEXAS; PINHEIRO, 2009).

Table 5 - Photosynthesis rate (A) and intrinsic water use efficiency (iWUE) in plants with and without water deficit at 5 days after treatment. FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2015.

Water deficit	A $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$	iWUE $\mu\text{mol CO}_2 [\text{mmol H}_2\text{O}]^{-1}$
Without deficit	37.10 * ¹	5.86 ^{ns}
With deficit	24.24	6.75
CV(%)	33.02	45.04

¹* or ^{ns} means differs or not between the without and with deficit conditions by t test ($p \leq 0.05$).

For the roots, 3 days after applying stress, the root dry matter had an isolated effect of plant and hydric condition factors (Table 6). Roots are the principal plant organ for nutrient and water uptake; an extensive root system is advantageous to support plant growth during the early crop growth stage to extract water from shallow soil layers, which is otherwise lost by evaporation. Roots traits have been claimed to be critical for increasing yield under soil-related stress. The rice crop has higher root dry matter, weedy rice has the lowest, while it is the same in barnyardgrass as in other plants. The plants subjected to drought had about 2.5-folds decreased root dry matter in this study (Table 7).

Table 6 - Root dry matter in rice, weedy rice, and barnyardgrass at 3 days of treatment. FAEM/UFPEL, Capão do Leão/RS, 2015.

Plants	Root dry matter (g plant ⁻¹)
Rice	2.35 a ¹
Weedy rice	1.08 b
Barnyardgrass	1.45 ab
CV(%)	23.49

¹Means followed by the same letter in the column do not differ for Duncan test ($p \leq 0.05$).

Table 7 - Root dry matter average between rice, weedy rice and barnyardgrass plants without or with water deficit at 3 days after treatment. FAEM/UFPEL, Capão do Leão/RS, 2015.

Hydric Condition	Root dry matter (g plant ⁻¹)
Without deficit	2.24 * ¹
With deficit	0.89
CV (%)	24.33

¹* or ^{ns} means differs or not between the without and with deficit by t test ($p \leq 0.05$).

After 5 days of applying stress, an interaction was observed between the tested factors. We did not observe any difference between the three tested plants under both the water conditions (Table 8). The three tested plants showed decreased root dry matter when subjected to drought; it was 56%, 45%, and 54% decreased in rice, weedy rice, and barnyardgrass, respectively. Development of the root system can improve drought resistance in plants. Although, there are controversial evidence of effect of drought stress on root growth, an increased growth due to water stress was reported in *Catharanthus roseus* (JALEEL et al., 2008); however, the root growth was not substantially inhibited under water stress in maize (SACKS; SILK; BURMAN, 1997). However, it could be observed that, even under moderate water stress, the 3 plants had reduced root dry matter, which demonstrated how this plant organ is sensitive to drought stress in rice, weedy rice, and barnyardgrass.

Table 8 - Root dry matter in rice, weedy rice, and barnyardgrass with or without water deficit at 5 days of treatment. FAEM/UFPEL, Capão do Leão/RS, 2015.

Plants	Root dry matter root (g plant ⁻¹)						
	Rice		Weedy rice		Barnyardgrass		
Without deficit	3.00	* ¹	ns ²	2.38	*	2.20	*
With deficit	1.31		ns	1.31		1.02	
CV (%)	41.21						

¹* or ^{ns} means differs or not between the without and with water deficit by t test ($p \leq 0.05$). ²Means followed by the same letter in the line do not differ for Duncan test ($p \leq 0.05$). ns= no significative.

For biochemical data, at 3 days of stress, no interaction was noted between the factors tested for any variable. We observed an isolated effect of the plants factor for

the variables protein content, activity of enzymes CAT and APX, H_2O_2 and TBARS, concentration of chlorophylls a, b, and total, and CR concentration (Table 9). The TBARS and chlorophyll b had isolated effect of hydric condition factor. For variables, the activity of SOD enzyme and proline content did not show any effect of the tested treatment.

Table 9 - Protein quantification, activity of the enzymes catalase (CAT) and ascorbate peroxidase (APX), chlorophyll a (Cha), b (Chb), total (Chtot), and carotenoid (CR) in rice, weedy rice, and barnyardgrass at 3 days of treatment. FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS.

	Rice	Weedy rice	Barnyardgrass	CV (%)
Protein (mg casein g ⁻¹ FW)	25.20 a ¹	25.38 a	10.39 b	17.69
CAT (AU mg ⁻¹ prot. min ⁻¹)	0.14 a	0.12 a	0.04 b	17.96
APX (AU mg ⁻¹ prot. min ⁻¹)	0.51 a	0.33 b	0.01 c	35.22
H ₂ O ₂ (mM g ⁻¹ FW)	8.84 a	5.34 b	0.18 c	19.76
TBARS (nM MDA g ⁻¹ de FW)	12.23 b	9.32 b	37.42 a	21.02
Cha (mg g ⁻¹ FW)	1.89 a	1.35 b	1.19 b	16.20
Chb (mg g ⁻¹ FW)	0.67 a	0.46 b	0.44 b	21.27
Chtot (mg g ⁻¹ FW)	2.56 a	1.81 b	1.67 b	16.60
CR (mg g ⁻¹ FW)	0.57 a	0.46 b	0.23 c	12.21

¹Means followed by the same letter in the line do not differ for Duncan test ($p \leq 0.05$). FW= fresh weight; AU= Activity unit, MDA= malondialdehyde

The protein content and the activities of the enzymes CAT and APX were lower in barnyardgrass than in rice and weedy rice. However, the APX activity was lower in weedy rice than in rice; therefore, rice and weedy rice showed about 60% more protein than barnyardgrass (Table 9). We observed that the barnyardgrass presented with a low activity of antioxidant enzymes CAT and APX, which were about 3- and 15-fold lower than those of rice, respectively. The higher activity of the CAT and APX enzymes in C3 plants were associated to the higher concentration of H_2O_2 in the tissues of these plants in relation to that found in barnyardgrass.

The activity of antioxidant enzymes is extremely variable in different species and even within the same species, depending upon the stage of development and growth conditions of the plant (NOCTOR; MHAMDI; FOYER, 2016). Therefore, we cannot

assign difference in enzymatic activity among the tested plants to a greater or worse response to its antioxidants system to drought stress, since the effect of water condition on the activity of antioxidant systems was not observed.

The H_2O_2 content of rice was highest, followed by those of weedy rice and barnyardgrass (Table 9). Very low concentrations of H_2O_2 was noted in barnyardgrass tissues, while it was 60% or more for the rice and weedy rice. For TBARS, an inverse behavior was observed to H_2O_2 , with the rice and weedy rice showing 4-fold lesser concentration in the tissues that barnyardgrass.

Generally, the chlorophylls a, b, and total contents were higher in rice plants than in the weeds (Table 9). The total chlorophyll content of weedy rice and barnyardgrass were 30% and 35% lower than that of rice, respectively. The highest CR concentration was noted in rice plants, followed by that in weedy rice and then in barnyardgrass. The CR concentration in rice was 20% and 60% higher than that that in weedy rice and barnyardgrass, respectively. We observed that 3 days of the experimental condition did not impose any significant effect on the plants under both the water conditions, which does not allow inferring about difference between their responses to stress in this time.

Lipid peroxidation generates malonic aldehyde (MDA), a product of the fatty acids decomposition of the biomembranes. The accumulation of MDA signifies the presence of ROS and oxidative stress (FAHEED, 2012). Lipid peroxidation is one of the most investigated consequences of ROS actions on membrane structures, being one of the first responses to stress-induced damage in the plant tissues (AMRI; SHAHSAVAR, 2010). The content of TBARS the plants showed 16% more of these compounds when subjected to 3 days of drought (Table 10), and chlorophyll b decreased by 20% under this condition. The increase in TBARS and reduction the Chb content may be responsible together with stomatal closure by reduction of photosynthetic rate observed in plants at 3-day stress.

Table 10 - Quantification the thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and chlorophyll b (Chb) average between rice, weedy rice, and barnyardgrass plants with or without water deficit 3 days of treatment. FAEM/UFPEl, Capão do Leão/RS, 2015.

Hydric Condition	TBARS (nM MDA g ⁻¹ de FW)	Chb mg g ⁻¹ FW
Without deficit	16.99 * ¹	0.58 *
With deficit	20.36	0.45
CV(%)	15.04	25.96

¹* or ^{ns} means differs or not between the without and with deficit by t test ($p \leq 0.05$). MDA= malonaldehyde. FW= fresh weight.

When the plants were under 5-day stress, the interaction among the factors were tested for variables: protein, H_2O_2 , and TBARS (Table 11). The isolated effect of plant factor for enzyme activity of CAT, APX, and SOD, proline content, Cha, Chb, and Chtot, and CR content were tested (Table 12). The variables proline and CR content isolated the effect of hydrocondition (Table 13).

Table 11 - Quantification of the protein, hydrogen peroxide (H_2O_2), and thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) in rice, weedy rice, and barnyardgrass with or without water deficit at 5 days of the treatment. FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2015.

	Rice		Weedy rice		Barnyardgrass	
	Protein (mg caseína g ⁻¹ FW)					
Without deficit	26.43	* ¹ a ²	25.25	* a	13.06	^{ns} b
With deficit	22.79	a	22.60	a	13.44	b
CV(%)	19.70					
	H ₂ O ₂ (mM g ⁻¹ FW)					
Without deficit	5.96	* a ²	3.67	* b	0.17	* c
With deficit	9.17	a	6.84	a	0.82	b
CV(%)	19.92					
	TBARS (nM MDA g ⁻¹ de FW)					
Without deficit	14.27	* b	9.73	* b	35.46	^{ns} a
With deficit	20.77	b	13.77	b	30.68	a
CV(%)	14.96					

¹* or ^{ns} means differs or not between the without and with deficit by t test ($p \leq 0.05$). Means followed by the same letter in the line do not differ for Duncan test ($p \leq 0.05$). FW= fresh weight; MDA= malonaldehyde.

A common effect of drought stress is the disturbance between the generation and quenching of ROS (FAIZE et al., 2011). During environmental stress such as drought, the ROS levels increase dramatically, resulting in oxidative damage to proteins and lipids. The H_2O_2 concentration under water deficit was highest in rice plants, followed by weedy rice and barnyardgrass (Table 11). Already, in plants with water deficit, the rice and weedy rice crops did not show difference in their H_2O_2 content; the barnyardgrass showed lower concentration of the same than the other two plants. The H_2O_2 content increased in 3 tested plants when exposed to water deficit; wherein, the increase was 53% in rice, 86% in weedy rice, and 380% in barnyardgrass. However, it should be emphasized that the H_2O_2 concentration found in barnyardgrass tissues was about 9-fold lower than those found in the other tested plants.

The disturbance in the equilibrium between the production and scavenging of ROS caused by stress led to sudden increase in the intracellular levels of ROS, which can cause significant attack on the membrane lipids and increase in lipid peroxidation.

Drought-induced overproduction of ROS increases the content of MDA, which has been considered as an indicator of oxidative damage (GILL; TUTEJA, 2010). TBARS concentration showed the opposite behavior to H_2O_2 concentration; rice and weedy rice had lower TBARS concentration than barnyardgrass under drought conditions. The rice and weedy rice plants had different TBARS levels between plants in water stress and control. An increase of around 40% of TBARS was noted in both the plants. Barnyardgrass did not have any change in the TBARS concentration under water stress conditions as compared to control.

Protein is found in all parts of a cell as it is fundamental in all aspects of structure and function. The change in protein levels may represent great damage to the growth and development of a plant. The rice and weedy rice plants had higher protein content than the barnyardgrass under both the water conditions tested (Table 11). The rice and weedy rice plants had about 10% decrease in their protein content under water deficiency, while the barnyardgrass plants did not show any change in the protein content when subjected to different water conditions. Total protein reduction is one of the consequences of drought stress that occurs because the ROS causes oxidation of the protein molecule (GILL; TUTEJA, 2010); this effect has also been reported for abiotic stress of wheat and rice tissues (BARTOLI et al., 2004)

The enzyme activities showed similar behavior under 3 stress days; the CAT activity was higher in rice, followed by that in weedy rice and barnyardgrass. The APX enzyme showed higher activity in rice and in weedy rice than in barnyardgrass. However, the barnyardgrass had an SOD activity that was 2.5-fold higher than that of rice and weedy rice (Table 12). The proline content was about 45% lower in barnyardgrass than that observed in rice and weedy rice at the time of evaluation. The chlorophylls a, b, total, and CR showed behavior similar to that at the first period of collection, with the rice having greater concentration of chlorophylls a, b, and total contents compared with weedy rice and barnyardgrass (Table 12). CR was higher in rice than in weedy rice and then in barnyardgrass.

Table 12 - Activity the enzymes catalase (CAT), ascorbate peroxide (APX), superoxide dismutase (SOD) and proline, chlorophyll a (Cha), b (Chb), total (Chtot), and carotenoid (CR) in rice, weedy rice, and barnyardgrass at 5 days of treatment. FAEM/UFPEL, Capão do Leão/RS. 2015.

	Rice	Weedy rice	Barnyardgrass	CV (%)
CAT (AU mg ⁻¹ prot. min ⁻¹)	0.34 a ¹	0.24 b	0.02 c	21.31
APX (AU mg ⁻¹ prot. min ⁻¹)	0.24 a	0.18 a	0.08 b	22.16
SOD (AUmg ⁻¹ prot. min ⁻¹)	1.64 b	1.85 b	4.51 a	19.35
Proline (μg proline g ⁻¹ FW)	24.04 a	24.90 a	13.79 b	12.67
Cha (mg g ⁻¹ FW)	2.32 a	1.71 b	1.79 b	15.32
Chb (mg g ⁻¹ FW)	0.82 a	0.67 b	0.68 b	17.29
Chtot (mg g ⁻¹ FW)	3.15 a	2.48 b	2.47 b	15.42
CR (mg g ⁻¹ FW)	0.62 a	0.47 b	0.32 c	16.06

¹ Means followed by the same letter in the line do not differ for Duncan test ($p \leq 0.05$). FW= fresh weight; AU= Activity unit

At 5 days of stress, the plants accumulated molecules with antioxidant activity and the proline and CR were increased in drought plants, although the proline content increased by about 85% (Table 13). The proline is a low molecular weight, highly soluble organic compound that provides protection to plants from stress by contributing to cellular osmotic adjustment, stabilizing of the subcellular structure, scavenging of free radical, and buffering of the cellular redox potential under stress condition. Proline accumulation normally occurs in the cytoplasm where it functions as molecular chaperons (HAYAT et al., 2012). In wheat, the proline levels in the leaf sheath increases in response to water shortage and performs a role as a drought resistance indicator (KARAMANOS, 1995). The CR concentration increased by 83% in drought plants in this study; an opposite result was reported for 4 japonica rice cultivars that had drastically degraded CR where subjected to severe water deficiency (CHA-UM et al., 2010). CR enhanced stress tolerance, including that against drought. Carotene acts as the first line of defense against ROS, and is very efficient in quenching ¹O₂. Researches showed that the levels of carotene in xanthophyll pigments, zeaxanthin, and antheraxanthin increases in drought stress (HASANUZZAMAN et al., 2012).

Table 13 - Quantification of the proline and carotenoid (CR) levels in plant with or without water deficit at 5 days of treatment. FAEM/UFPEL, Capão do Leão/RS, 2015.

	Proline	CR
	($\mu\text{g proline g}^{-1}\text{FW}$)	($\text{mg g}^{-1}\text{FW}$)
Without deficit	14.89 ^{*1}	0.43 [*]
With deficit	27.73	0.83
CV(%)	11.07	29.02

^{1*} or ^{ns} means differs or not between the without and with deficit by t test ($p \leq 0.05$). FW= fresh weight.

Our results indicated that the rice and weedy rice plants showed an increased level of H_2O_2 concentration in the tissues at 5 days of water deficit stress, which caused an increase in the oxidative damages in the membrane, as evaluated by TBARS level and reduced protein content. These parameters were unaffected by water deficit in barnyardgrass. However, the results did not show any differential response of these plants in their antioxidants system when submitted to water deficit, which can be attributed to the fact that the stress condition was not extreme or that, at that time, the plants were not in a condition to demonstrate the differential antioxidant responses.

The Pearson's correlation analysis for the photosynthetic, biochemical, and roots variables in both the evaluation periods presented positive and negative correlations (Table 14). The positive correlation indicates that, for each unit that increases in variable X, a corresponding increase occurs for one unit in the variable Y. The negative correlation on the other hand indicates that increase of one variable results in the decrease of the other one.

At 3 days of the treatment, of the 153 possible correlations, 52% were found to be significant (Table 15). For example, A value showed 11 significant correlations for 17 possible correlations, where 54% were negative and 46% were positive. The A value showed negative correlation with variables such as the activity of the enzymes CAT, APX, H_2O_2 , and CR, which indicates that the decrease in the photosynthesis rate is directly correlated to an increase in the ROS level and the activity of plants in an antioxidant system.

The evaluation at 5 stress days showed that 60% possible correlations were significant (Table 15). The A value in this evaluate time showed 13 significant correlation, where 86% were negative and only 14% were positive. It is noteworthy that negative correlation were observed for activity of the enzymes CAT, APX, H_2O_2 , and CR; however, this time, we verified the results for Cht and proline, demonstrating higher response of antioxidant system at 5 stress days than at 3 stress days.

Table 14 - Pearson's correlation between the variables photosynthesis rate (A), stomatal conductance (gs), substomatal concentration CO₂ (Ci), transpiration (E), carboxylation efficiency (CE), intrinsic water-use efficiency (iWUE), root dry matter (RDM), protein (Prot), activity of enzymes catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), ascorbate peroxide (APX), hydrogen peroxide (H₂O₂), thiobarbituric acid reactive substance (TBARS), proline (Prol), chlorophyll a (Cha), b (Chb), total (Chtot), and carotenoids (CR) in rice, weedy rice, and barnyardgrass with and without water deficit at 3 days of treatment. FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2015.

	A	gs	Ci	E	CE	iWUE	RDM	Prot	SOD	CAT	APX	H ₂ O ₂	TBARS	Prol	Cha	Chb	Chtot	CR
A	1.00																	
gs	0.06 ^{ns1}	1.00																
Ci	-0.66*	0.64*	1.00															
E	0.13 ^{ns}	0.93*	0.45*	1.00														
CE	0.96*	-0.84*	-0.79*	0.11 ^{ns}	1.00													
iWUE	0.91*	-0.27 ^{ns}	0.15 ^{ns}	-0.15 ^{ns}	0.96*	1.00												
Root	0.27 ^{ns}	-0.50*	0.35 ^{ns}	0.33 ^{ns}	0.06 ^{ns}	0.12 ^{ns}	1.00											
Prot	-0.81*	0.27 ^{ns}	0.72*	0.08 ^{ns}	-0.84*	-0.87*	0.01 ^{ns}	1.00										
SOD	0.42*	-0.20 ^{ns}	-0.31 ^{ns}	0.33 ^{ns}	0.61*	-0.50*	-0.16 ^{ns}	-0.51*	1.00									
CAT	-0.86*	0.28 ^{ns}	0.78*	0.03 ^{ns}	-0.93*	-0.92*	0.15 ^{ns}	0.79*	-0.40*	1.00								
APX	-0.72*	0.45*	0.68*	0.20 ^{ns}	-0.80*	-0.79*	0.23 ^{ns}	0.80*	-0.19 ^{ns}	0.82*	1.00							
H ₂ O ₂	-0.73*	0.27 ^{ns}	0.69*	-0.01 ^{ns}	-0.85*	-0.82*	-0.26 ^{ns}	0.79*	-0.42 ^{ns}	0.85*	0.85*	1.00						
TBARS	0.86*	0.44*	-0.81*	-0.26 ^{ns}	0.94*	0.94*	-0.22 ^{ns}	-0.86*	-0.42 ^{ns}	0.89*	-0.78*	-0.76*	1.00					
Prol	-0.24 ^{ns}	-0.19 ^{ns}	0.10 ^{ns}	-0.35 ^{ns}	-0.29 ^{ns}	-0.26 ^{ns}	0.03 ^{ns}	0.59*	-0.27 ^{ns}	0.43 ^{ns}	0.47 ^{ns}	0.42 ^{ns}	0.37*	1.00				
Cha	-0.19 ^{ns}	-0.33 ^{ns}	0.48*	0.11 ^{ns}	-0.33 ^{ns}	-0.44*	0.48*	0.53*	-0.15 ^{ns}	0.49*	0.60*	0.62*	-0.45 ^{ns}	0.56*	1.00			
Chb	0.09 ^{ns}	-0.28 ^{ns}	-0.29 ^{ns}	0.10 ^{ns}	-0.11 ^{ns}	-0.24 ^{ns}	0.63*	0.23 ^{ns}	-0.13 ^{ns}	0.33 ^{ns}	0.34 ^{ns}	0.45 ^{ns}	-0.33 ^{ns}	0.33 ^{ns}	0.75*	1.00		
Cht	-0.10 ^{ns}	-0.35 ^{ns}	0.45*	0.27 ^{ns}	-0.28 ^{ns}	0.39 ^{ns}	0.56*	0.41 ^{ns}	0.12 ^{ns}	0.46*	0.49*	0.61*	-0.40 ^{ns}	0.52*	0.98*	0.87*	1.00	
CR	-0.74*	0.40 ^{ns}	0.80*	0.12 ^{ns}	-0.84*	-0.87*	0.27 ^{ns}	0.86*	0.37 ^{ns}	0.86*	0.84*	0.91*	-0.81*	0.58*	0.77*	0.46 ^{ns}	0.72*	1.00

¹*significant and ^{ns} not significant p ≤ 0.05.

Table 15 - Pearson's correlation between the variables Photosynthesis rate (A), stomatal conductance (gs), substomatal concentration CO₂ (Ci), transpiration (E), carboxylation efficiency (CE), intrinsic water-use efficiency (iWUE), root dry matter (RDM), protein (Prot), activity of enzymes catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), ascorbate peroxide (APX), hydrogen peroxide (H₂O₂), thiobarbituric acid reactive substance (TBARS), proline (Prol), chlorophyll a (Cha), b (Chb), total (Chtot), and carotenoids (CR) in rice, weedy rice, and barnyardgrass with and without water deficit at 5 days of treatment. FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2015.

	A	gs	Ci	E	CE	iWUE	RDM	Prot	SOD	CAT	APX	H ₂ O ₂	TBARS	Prol	Cha	Chb	Chtot	CR
A	1.00																	
gs	0.10 ^{ns1}	1.00																
Ci	-0.22 ^{ns}	0.91*	1.00															
E	0.55*	0.71*	0.51*	1.00														
CE	0.81*	-0.48*	-0.72*	0.19 ^{ns}	1.00													
iWUE	0.66*	-0.49 ^{ns}	-0.61*	-0.01 ^{ns}	0.87*	1.00												
Root	0.25 ^{ns}	0.68*	0.68*	0.74*	-0.08 ^{ns}	-0.15 ^{ns}	1.00											
Prot	-0.63*	0.49*	0.65*	0.03 ^{ns}	-0.83*	-0.84*	0.19 ^{ns}	1.00										
SOD	0.54*	-0.60*	-0.70*	-0.09 ^{ns}	0.86*	0.90*	-0.16 ^{ns}	-0.87*	1.00									
CAT	-0.61*	0.33 ^{ns}	0.66*	0.06 ^{ns}	-0.79*	-0.84*	0.33 ^{ns}	0.71*	-0.81*	1.00								
APX	-0.67*	0.27 ^{ns}	0.49*	0.23 ^{ns}	-0.67*	-0.57*	0.07 ^{ns}	0.73*	-0.57*	0.63*	1.00							
H ₂ O ₂	-0.84*	0.21 ^{ns}	0.41 ^{ns}	-0.25 ^{ns}	-0.82*	-0.87*	0.16 ^{ns}	0.75*	-0.80*	0.78*	0.68*	1.00						
TBARS	0.51*	0.65*	-0.68*	-0.20 ^{ns}	0.83*	0.92*	-0.28 ^{ns}	-0.74*	0.93*	-0.84*	-0.57*	-0.83*	1.00					
Prol	-0.66*	-0.18 ^{ns}	-0.04 ^{ns}	-0.50*	-0.51*	-0.55*	0.32 ^{ns}	0.53*	-0.47*	0.51*	0.48*	0.75 ^{ns}	-0.40 ^{ns}	1.00				
Cha	-0.51*	-0.12 ^{ns}	0.18 ^{ns}	0.24 ^{ns}	-0.45*	-0.18 ^{ns}	-0.10 ^{ns}	0.38 ^{ns}	-0.18 ^{ns}	0.45*	0.44*	0.44 ^{ns}	-0.12 ^{ns}	0.50*	1.00			
Chb	-0.52*	-0.19 ^{ns}	0.12 ^{ns}	0.30 ^{ns}	-0.43 ^{ns}	-0.17 ^{ns}	-0.09 ^{ns}	0.36 ^{ns}	-0.13 ^{ns}	0.40 ^{ns}	0.51 ^{ns}	0.41 ^{ns}	-0.05 ^{ns}	0.44*	0.94*	1.00		
Cht	-0.52*	-0.14 ^{ns}	0.17 ^{ns}	0.27 ^{ns}	-0.45*	0.18 ^{ns}	-0.10 ^{ns}	0.38 ^{ns}	-0.17 ^{ns}	0.45*	0.46*	0.44 ^{ns}	-0.10 ^{ns}	0.69*	0.99*	0.96*	1.00	
CR	-0.77*	0.08 ^{ns}	0.34 ^{ns}	0.29 ^{ns}	-0.76*	-0.68*	-0.13 ^{ns}	0.64*	-0.67*	0.74*	0.62*	0.85*	-0.59*	0.58*	0.81*	0.72 ^{ns}	0.80*	1.00

¹*significant and ^{ns} not significant p ≤ 0.05.

The efficiency of reference primer amplification was calculated together for different sample plants, from the logarithm (Log), the cDNA dilution for rice, weedy rice, and barnyardgrass (Table 1). The sample dilution 1:25 was found to be most effective, and it was subsequently used for validation with the target gene. The primer efficiencies ranged from 1.80 to 2.20 for rice, 2.04 to 2.46 for weedy rice, and 1.04 to 2.20 for barnyardgrass (Table 1), where the primer efficiency was expected to be 1.8–2.2. We discarded primers with efficiency below or above this value. The specificity of candidate reference genes and target genes were confirmed by the existence of a single peak in the melting curve and a single band on 1% agarose gel after electrophoresis. In addition, no RT-qPCR detection signals were observed in the no-template control and in the reverse-transcription negative control reaction. These results allowed the use of the designed primer for gene expression analysis by RT-qPCR.

In this study, the reference primers that were fit for use in the three plants tested were the endogenous ribosomal gene 18SrRNA (*Os18S*), initiation factor 4 α eukaryotes (*OsElf-4a*), β -Tubulin (*Os β -tub*), ubiquitin-conjugating enzyme E2 (*OsUBC-E2*), and ubiquitin 10 (*OsUBQ10*); hence, these primers were used in the stability test. The primers actin (*OsACT*) and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (*OsGAPDH*) showed unexpected efficiency in one or more species.

We used the quantification cycle (Cq) value to determine the expression level of the candidate reference genes evaluated in this study. The results showed that the *OsElf-4a* was the least expressed gene, with the highest mean Cq value of 34.79 (Figure 1, Table 2). On the other hand, *Os18S* was the most expressed gene in this study, with the lowest mean Cq value of 19.13 (Figure 1, Table 14). Moreover, *OsElf-4a* showed the maximum variation in the expression level, as showed by large whiskered tap and box in Figure 1 as compared to those for the other genes.

The stability of endogenous genes were studied from the overall average (X), standard deviation (SD), and coefficient variation (CV) of Ct values, and the three different plants were analyzed together (Table 16). *OsElf-4a* and *Os β -tubu* showed the highest SD (1.38 and 1.18, respectively) and CV (7.26 and 3.49, respectively) than other candidate references primers. The *OsUBC-E2* and *OsUBQ10* had lower SD (0.74 and 0.75) and CV (2.33 and 2.52), respectively.

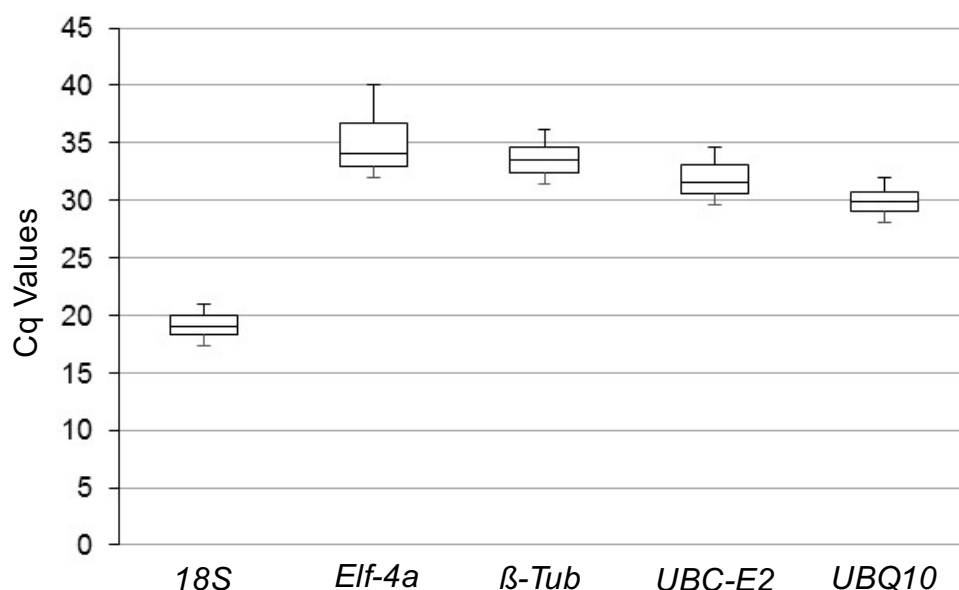


Figure 1 - The expression levels of different candidate reference genes 18SrRNA (18S), initiation factor 4 α eukaryotes (Elf-4a), β -Tubulin (β -Tub), ubiquitin-conjugating enzyme E2 (UBC-E2), and ubiquitin 10 (UBQ10). Expression data displayed as RT-qPCR quantification cycle (Cq) values for each reference gene in rice, weedy rice, and barnyardgrass submitted or not to drought for 5 days. The line across the box is depicted as the median. The box indicates the 25th and 75th percentiles, and the whisker caps represent the maximum and minimum value. The higher the box and whisker, greater is the variation. FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2015.

Table 16 - Overall average (X), standard deviation (SD), and coefficient variation (CV) of different candidate reference genes 18SrRNA (*Os18S*), initiation factor 4 α eukaryotes (*OsElf-4a*), β -Tubulin (*Osβ-Tub*), ubiquitin-conjugating enzyme E2 (*OsUBC-E2*), and ubiquitin 10 (*OsUBQ10*) for rice, weedy rice, and barnyardgrass. FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2015.

	Candidate reference genes				
	<i>Os18S</i>	<i>OsElf-4a</i>	<i>Osβ-Tub</i>	<i>OsUBC-E2</i>	<i>UBQ 10</i>
X	19.13	34.79	33.82	31.82	29.86
SD	0.95	1.38	1.18	0.74	0.75
CV	2.74	7.26	3.49	2.33	2.52

High RT-qPCR efficiency is usually correlated with robust and precise results of gene expression (BUSTIN et al., 2009). A suitable reference genes showed a constant expression level among the samples evaluated. The results showed that the *OsElf-4a* was the least expressed gene and that the *Os18S* was the most expressed gene. Similar result was demonstrated by Jain et al. (2006), which reported that *Os18S* gene was most expressed after evaluating 10 candidate reference genes in rice sample submitted to abiotic stress. Moreover, in studies identifying the most suitable reference gene for abiotic stress in soybean, 13 candidate genes collected from literature were evaluated for stability of expression under different stressors, and the *18S* gene was

excluded from the list of candidates due to its extremely high abundance (LE et al., 2012), cDNA for the samples analyzed with *18S* primer had to be diluted at least 1000-fold relative to all other candidate genes to avoid the signal saturation obtained at low Ct value. This dilution introduced a random element of variability that can potential alter the apparent expression level of target genes normalized with *18S* (LE et al., 2012).

The main characteristic of a reference gene is the expression stability, which is not affected by the tissue type, developmental periods, or physiological condition (GALLI et al., 2015). RefFinder is a user-friendly web-base, which integrates the comparative Ct method, BestKeeper, NormFinder, and geNorm. These tools were developed for evaluating and screening the reference genes. The small differences observed between the stability estimation ranking determined by these methods were expected based on the difference in the design of the algorithms in the alternative approaches.

Overall, the results of these methods were similar: the most unstable gene was found to be *OsElf-4a* and then *Os18S*. For the most stable candidate reference genes, according to the ΔC_t method, the *OsUBC-E2* gene was the first gene of the rank, indicating that it is the most stable gene (Figure 2A), followed by *OsUBQ10*. According to BestKeeper, only *OsUBQ10* and *OsUBC-E2* genes should be considered as reference genes, because these genes showed SD <1 (Figure 2B). All tested genes showed a stability value (M) lower than the cut-off value (M >1.5) and were considered stable according to NormFinder (Figure 2C); this method indicated that *OsUBC-E2* and *OsUBQ10* were the most stable genes; same results were reported by geNorm and RefFinder (Figures 2D and 2E).

Besides, integrating the four methods, the RefFinder software used the Cq value to assign an appropriate weight to an individual gene and calculated the geometric mean of their weight for overall final ranking, based on the ranking from each of the four programs (Figure 2E). Although the RefFinder did not indicate a cut-off value to classify a reference gene as stably or unstably expressed, this software provides a ranking of the candidate gene with lower ranking indicating that a gene is stably expressed under the evaluated experimental condition, thereby recommending it as an ideal reference gene. Therefore, we used RefFinder as a confirmatory tool to finally select the most suitable reference gene, since small difference in the rank of expression stability was observed among the evaluation approaches.

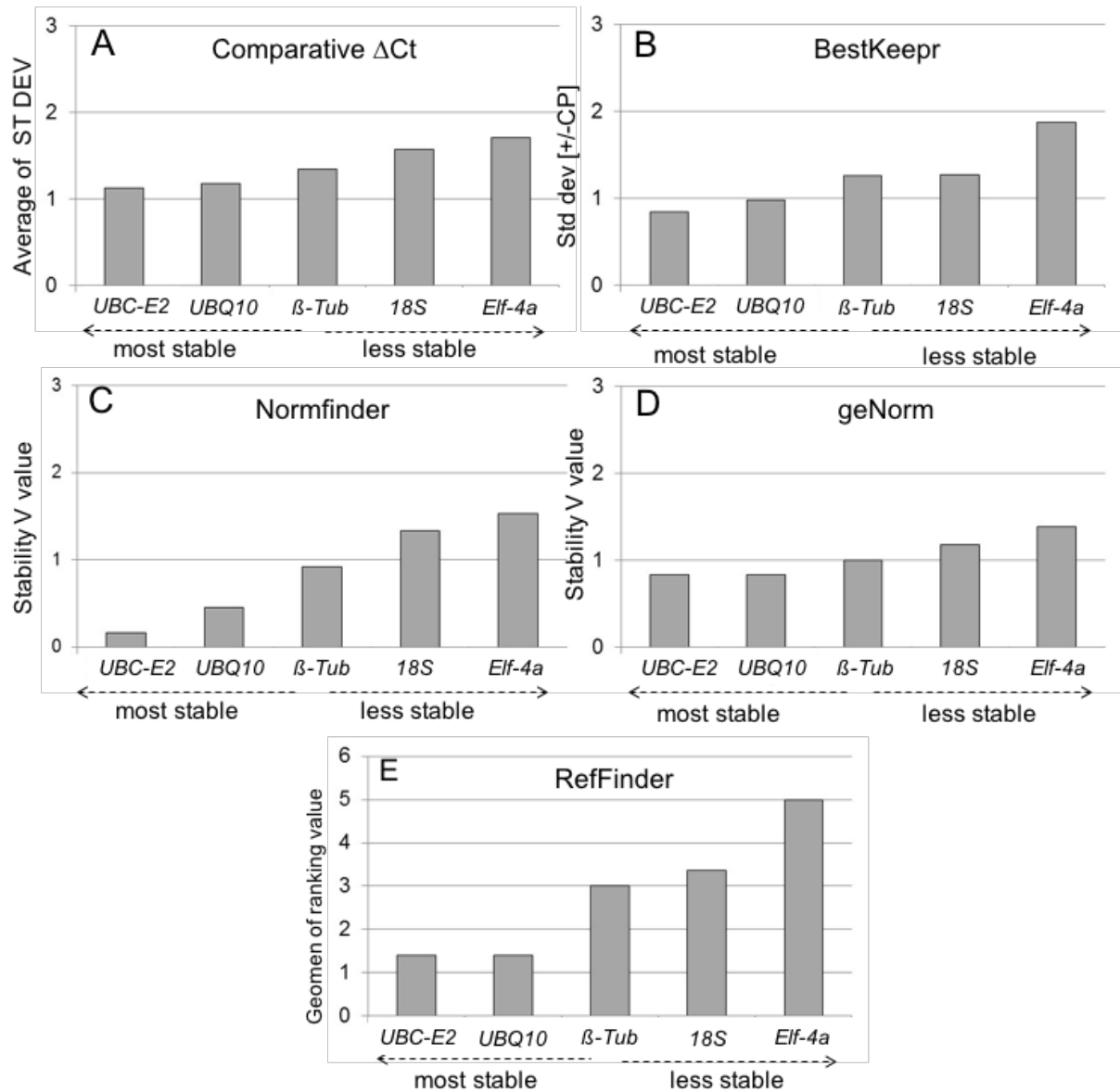


Figure 2 - Expression stability of different candidate reference genes 18SrRNA (*18S*), initiation factor 4 α eukaryotes (*Elf-4a*), β -Tubulin (β -*Tub*), ubiquitin-conjugating enzyme E2 (*UBC-E2*), and ubiquitin 10 (*UBQ10*) in rice, weedy rice, and barnyardgrass subjected or not to drought calculated by the comparative delta-Ct method (A), BestKeeper (B), NormFinder (C), geNorm (D), and RefFinder. FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2015.

The recommended comprehensive ranking of stability for the research with rice, weedy rice, and barnyardgrass submitted to drought was determined as *OsUBC-E2* > *OsUBQ10* > *Os β -Tub* > *Os18S* > *OsElf-4a*. Therefore, the overall results indicate the novel candidate reference gene as the most suitable one to normalize gene expression data with rice, weedy rice, and barnyardgrass under the tested conditions.

Overall, the traditional genes commonly used to normalize RT-qPCR data, *OsElf-4a*, and *Os18S* were found to be most unstable candidate reference genes. These candidate reference genes also demonstrated high variation in the expression

level. These results indicate that *OsElf-4a* and *Os18S* are not suitable to normalize the RT-qPCR data in the sample of the present study. In earlier studies, *18S* was found to be the most reliable gene for normalization of real-time PCR data in rice from among the four genes tested (KIM et al., 2003). Due to a set of samples and genes tested, however, it remained unclear whether these and other conventionally used reference genes were in fact the best possible choices for normalizing the gene expression data in rice. Numerous studies have shown that the expression of even the housekeeping genes can vary under specific situations (THELLIN et al., 1999). This may partly be explained by the fact that housekeeping genes are not only implicated in the basal cell metabolism but also participate in other cellular functions.

The traditional protein-coding β -Tubulin displayed unacceptably high expression variability limiting their use as an internal control. Both *OsUBC-E2* and *OsUBQ10* were most stably expressed. Furthermore, *UBQ10* demonstrated highly stable expression in *Arabidopsis* in an earlier study (CZECHOWSKI et al., 2005), although in different rice tissues and distinct development phases, *OsUBQ10* was found to be the most unstable gene tested (JAIN et al., 2006). *UBC-E2* was the most stable gene in *Hevea brasiliensis* under different abiotic stress conditions (LI; BAO-ZHEN; WEI-MING, 2012). These results confirmed that there is typically no universally applicable reference gene for all experimental conditions, and that the traditional reference transcripts may not always show constitutive expression as often assumed.

The high expression stability of a gene indicates that the use of a single internal control gene is appropriate (Figure 2). However, for some studies, no single gene may be adequate and may require normalization with two or more stable internal control genes. The geNorm program also indicates the minimum number of reference genes for accurate normalization by calculating the pairwise variation V_n/V_{n+1} between two sequential normalization factors to determine the necessity of adding the next more consistent reference gene. According to this criterion, the $V_{2/3}$ value was lower than the cut-off value of 0.15 in the sample analyzed (0.014), suggesting that two reference genes are sufficient to normalize gene expression data in these samples (Figure 3). Although, the use of either *OsUBC-E2* or *OsUBQ10* as an internal control may be sufficient for gene expression studies in rice, weedy rice, and barnyardgrass due to their high expression stability, the use of both is recommended for achieving better results.

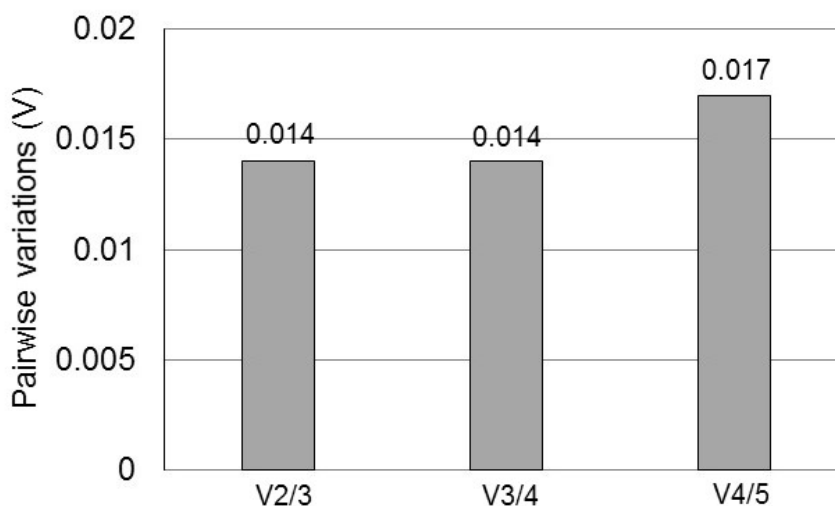


Figure 3 - Pairwise variation (V) calculated by geNorm to determine the minimum number of reference genes for accurate normalization in rice, weedy rice, and barnyardgrass subjected or not to drought. FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2015.

The results were calculated using *OsUBC-E2* and *OsUBQ10* as housekeeping gene and reference treatment for the rice without deficit. In this way, the expression for all genes under this treatment was equal to 1. An interaction was noted between the factors of treatment plants and water conditions for variable expression of *OsAPX2*, *OsHSP24.15*, *OsHSP 71.10*, and *OsHS 85.88* (Figures 4).

The expression of *APX* is modulated by several environmental stimuli that are known to increase ROS production and get induced by H_2O_2 . Also, in the leaves of C_3 plants, the peroxisomes are the major site of H_2O_2 production, followed by chloroplasts during photosynthesis (SOFO et al., 2015). Both, in plants without and with water deficit, *OsAPX2* expression was higher in weedy rice than in rice and barnyardgrass. The basal expression of *OsAPX2* between plants were different in the study. We observed that the expression in C_3 plants (rice and weedy rice) was higher than in C_4 plant (barnyardgrass) (Figure 4A). The expression of *APX* is induced by H_2O_2 (SOFO et al., 2015), which may explain the higher expression in C_3 plants, because higher concentration of H_2O_2 was verified in the tissues of these plants than in barnyardgrass.

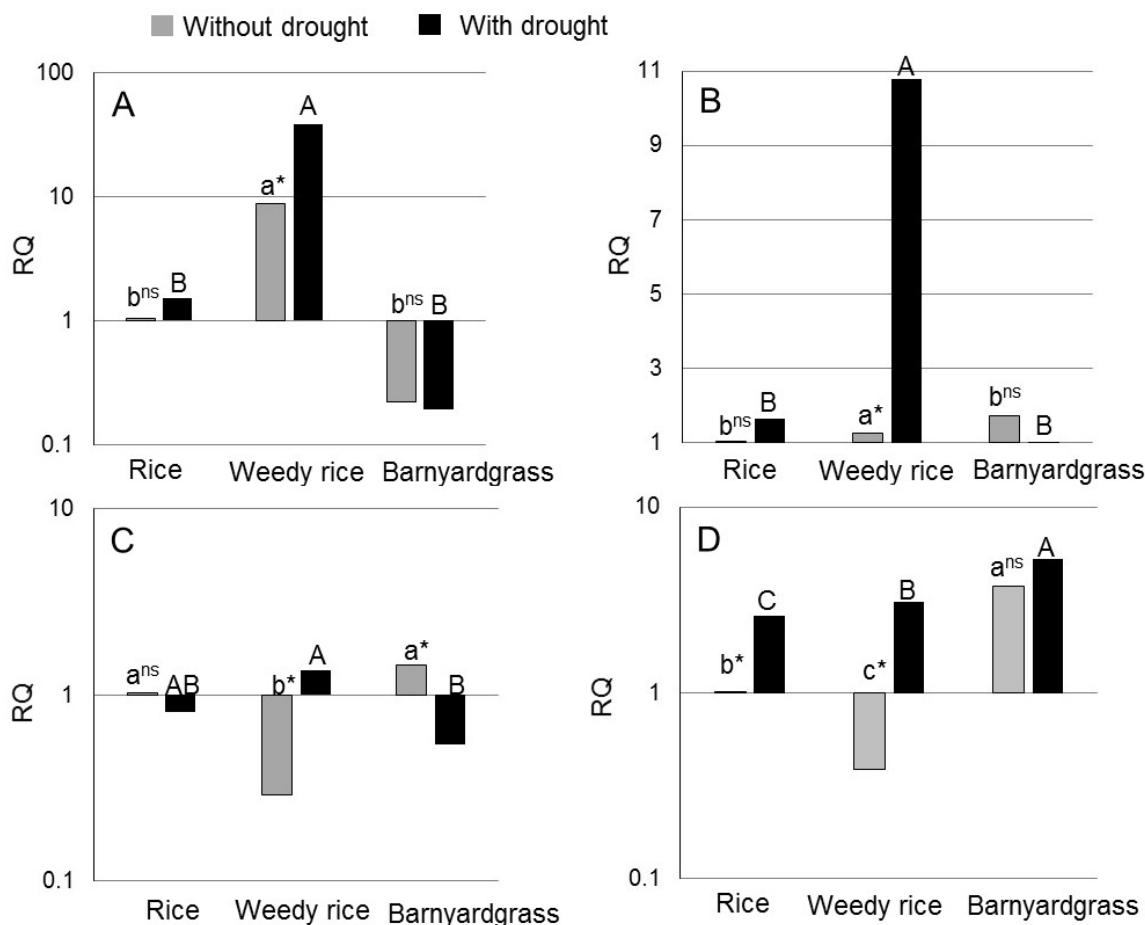


Figure 4 - Relative expression (RQ) profiles of *OsAPX2* (A), *OsHSP24.15* (B), *OsHSP71.10* (C) and *OsHSP81.88* in rice, weedy rice, and barnyardgrass subjected or not to water deficit. * or ns means differs or not between the without and with deficit conditions by t test ($p \leq 0.05$). Bars followed by the same lowercase letter indicates that the means do not differ from another in without deficit plants by Duncan test ($p \leq 0.05$). Bars followed by the same capital letter indicates that means do not differ from another in with deficit plants by Duncan test ($p \leq 0.05$). FAEM/UFPEl, Capão do Leão/RS, 2015.

Rice and barnyardgrass did not have verified differences between plants with or without drought; however, weedy rice plants under drought conditions showed about 4-fold more expression of *OsAPX2* gene than of weedy rice plant without water deficit (Figure 4A). The expression of *OsAPX2* in rice is reported in several studies as being induced by drought. Rice plants subject to 15 days of drought had 20-fold increased *OsAPX2* expression (ROSA et al., 2010). In our study, the increase in the expression of this gene in rice leaves was not verified, and the same occurred for the barnyardgrass. This discrepancy could be due to the distinct responses of *APX* in different species and to different magnitudes of stress.

The *OsHSP24.15* belongs to the sHSP, the number of sHSPs varies across individual plant species, for instance, it is 23 for rice (WATERS, 2013). We observed

that, for this gene, the expression in without water deficit were not different among the three tested plants. However, in water deficit plants, the weedy rice had about 9-fold more *OsHSP24.15* expression than rice and barnyardgrass (Figure 4B). Only weedy rice showed difference between with and without water deficit plants, where the plants subjected to water deficit had 8-fold greater gene expression than plants not subjected to the same.

Transgenic rice seedling was found to be drought tolerant and showed overproduction of *OsHSP24.15* (SATO; YOKOYA, 2008). *sHSPs* were found to be associated with thermotolerance (AMANO; IIDA; KOSUGE, 2012). However, some researches showed that the *sHSPs* are expressed during specific stages of plant development and that their expression during seed development is most extensively characterized (WEHMEYER; VIERLING, 2000). However, *sHSP* expression data reported in the literature indicates no single pattern of gene expression for all plant *sHSP*. In fact, it is now clear that not even all the members of the same *sHSP* subfamily follow the same expression patterns.

OsHSP71.10 belongs to an important *HSP70* family. Several researchers showed that these gene families in the same plants species were involved in the development and tolerance to a variety of stress (DUAN et al., 2010; GRIGOROVA et al., 2011; MERTZ-HENNING et al., 2016). In this work, we observed that without drought condition, rice and barnyardgrass plants expressed more *OsHSP71.10* than weedy rice. *In the plants subjected to drought, weedy rice expressed more OsHSP71.10* than barnyardgrass, and the rice did not differ from weedy rice and barnyardgrass. The *OsHSP71.10* expression did not change in rice plants with or without drought. However, weedy rice showed an increase of about 5-fold when the plants were under drought stress (Figure 4C). On the other hand, barnyardgrass showed about 2-fold reduced expression of the gene when subjected to drought. *HSP70* can prevent aggregation of denatured proteins and can refold stress-denatured proteins (SUNG-RYUL.; AN, 2013).

Although the cytosolic *HSP 90* expression are constitutively expressed in most organisms, their expression increases in response to stress in both prokaryotes and eukaryotes. The *OsHSP85.88* expression in both the water conditions was higher in barnyardgrass, followed by that in weedy rice and then in rice (Figure 4D). The three tested plants showed an increase in the *OsHSP85.88* expression when subjected to drought, as with an increase of about 3-, 8-, and 1.5-folds for rice, weedy rice, and

barnyardgrass, respectively. The expression of HSP90 in *Arabidopsis* is developmentally regulated and responds to drought, heat, cold, and salt stress (KRISHNA; GLOOR, 2001).

The gene expression of *HSPs* stress response is a rapid and transient gene-expression program, as the gene expression increases rapidly to reach the maximum levels after 10–15 min (RICHTER; HASLBECK; BUCHNER, 2010). Nevertheless, some genes peak slightly later (after 20 min) and others do not increase until after 2 h (MATSUURA et al., 2010). However, when analyzed in detail, the expression kinetics for individual stress-inducible genes are quite diverse. In this way, each plant presents an expression pattern of different *HSPs* that varies according to the stage of development, tissue, type of stress, and the time of exposure to this stress.

In addition, *HSPs* were induced in response to a combination of drought and heat shock, which included cytosolic *HSP90*, *HSP70*, and *HSP100*, and sHSPs (cytosolic, mitochondrial, and chloroplastic) genes. Furthermore, the induction of *HSPs* was higher in response to the combination of drought and heat shock than to them individually (RIZHSKY; LIANG; MITTLER, 2002). In our research, we submitted the plants only to drought conditions through PEG application. It is unclear whether this single application may have generated only a mild effect on the plants' molecular response. However, in the experimental condition in which these plants were exposed, we observed that biggest response to transcripts number of different genes analyzed happened in weedy rice. Rice and weedy rice, despite being the same botanical genus differing terms of these gene expression more than in rice and barnyardgrass. Further studies should be performed to establish a gene expression pattern between these plants.

In general, it was observed that the physiological behavior in rice and weedy rice plants when in drought conditions was similar. When exposed to hydric deficit the plants showed stomatal closure, which reduced the water loss by evapotranspiration, but on the other hand, can be attributed to the CO_2 reduction availability within the leaf, and consequently in the rubisco active site. This situation, led to photorespiration increased, as well as may cause disorder in the electron transport chain, resulting in increased the ROS concentration in tissues. Until 3 drought days were not able to observe accumulation of H_2O_2 , however it was already evidenced by lipid damage and chlorophyll b degradation in both plants.

At 5 droughts days, the stomatal closure and photosynthesis reduction continued be observed in the C3 plants, being at this evaluation possible evidence of H_2O_2 accumulation. Responses of enzymatic antioxidant system were not verified from the plantas under drought condition, however, accupation of proline and carotenoids, which are part of non-enzymatic antioxidant system was observed. Despite the antioxidant activity, rice and weedy rice plants when drouth condition showed increase in lipid and protein damage.

In contrast to the physiological variables, the rice and weedy rice plants differed in gene expression of protein responsive to drought stress. The evaluated genes expression were more responsive to drought in weedy rice than in rice. Weddy rice in drought condition increased expression the genes *OsAPX2*, *OsHSP24.15*, *OS71.10* and *OsHSP81.88*; whereas in the rice only the gene *OsHSP81.88* was expressed more in water deficit condition. Despite this difference in gene expression intil 5 droughts days, it was not possible to observe differences between rice and weedy rice, about the reduction of damage caused by stress. That it was observed in both stressed plants reduction of around 10% of proteins and increased in 40% of TBARS when compared the control.

However, in barnyardgrass there was no evidence of stomatal closure, since the reduction in gs in plants with hydric deficit did not happens, all the same time there was reduction in photosynthetic rate in estressed barnyardgrass, but this plant continued about 40% more photosynthetical efficient than tested C3. Water deficit caoused increased in H_2O_2 content in barnyardgrass, but this increase seems to be more related in this case to cell signaling than in oxidative damage. Because there was no increase in TBARS or reduction in protein in C4 plant.

About the genes expression, the drought inhibited the *OsHSp71.10* expression, and stimulated the *OsHSP81.88* expression. Analyzing the three tested plants, it is verified that water deficit stimulated the espressin of the *OsHSO81.88* gene in all these plants, being possible to use this gene as a stress marker in later studies.

2.4 Conclusions

In hydric deficit conditions, the rice and weedy rice plants have more cellular damage than barnyardgrass.

The three plants show reduce photosynthetic rate under drought conditions, mainly due to stomatal closure; rice and weed rice had increase damages to lipids and protein at 5 days of drought; however, barnyardgrass do not affect the biochemical parameters under the same drought conditions.

Our results indicate that two normalizing genes (*OsUBC-E2* and *OsUBQ10*) are sufficient for proper quantitative by RT-qPCR analysis in rice, weedy rice, and barnyardgrass under drought.

3 CAPÍTULO II – Respostas fisiológicas, bioquímicas e moleculares em arroz, arroz-vermelho e capim-arroz expostos a temperaturas supra ótimas.

3.1 Introdução

Em termos de consumo direto, o arroz é a cultura mais importante mundialmente, servindo de alimento básico para mais de 50% da população mundial (FAO, 2017). Por ser planta C3 cultivada no verão, em regiões tropicais e subtropicais é extremamente propensa a sofrer danos devidos a altas temperaturas (CHALLINOR, 2007), as quais tendem a ser um dos estresses abióticos mais limitante para a produção agrícola.

Estudos mostram que a temperatura média global pode aumentar de 0,3 a 4,8°C até o final do século (IPCC, 2017). Tanto o aumento da temperatura média quanto os episódios de temperatura extremas por curtos períodos de tempo causam impactos negativos no crescimento e no desenvolvimento de culturas (WHEELER et al., 2000; McKEOWN et al 2005).

Além dos estresses abióticos, como alta temperatura, cabe ressaltar que na maior parte das lavouras a cultura não se desenvolve isolada, ou seja, normalmente é acompanhada de plantas daninhas. As duas principais plantas daninhas nas lavouras de arroz da região sul do Brasil são o arroz-vermelho e o capim-arroz.

O arroz-vermelho, assim como o arroz cultivado é uma planta C3, destacando-se como a principal planta daninha que infesta as lavouras de arroz irrigado, sendo responsável pela redução do potencial de produtividade do cereal, com perdas

estimadas em torno de US\$ 300,00 ha⁻¹ (BURGOS et al., 2006). Sua presença ocasiona perdas de produtividade pela competição por recursos do ambiente (luz, água e nutrientes) (SHIVRAIN et al., 2010). Por sua vez, o capim-arroz é uma planta C4, altamente competitiva com arroz, devido à sua adaptação a ambientes alagados, grande produção de sementes e crescimento rápido (MARAMBE; AMARASINGLE, 2002).

A rota fotossintética das plantas interfere diretamente nas respostas dessas a estresses abióticos. O mecanismo de fotossíntese C4 parece ter evoluído como um dos principais mecanismos de concentração de carbono em plantas terrestre, com finalidade de minimizar a atividade oxigenase da rubisco e consequente a perda de carbono por meio de fotorrespiração. Plantas C4 tem como primeiro intermediário estável da fotossíntese compostos com quatro carbonos (malato e aspartato), ou seja, no ciclo C4, em vez da rubisco, a enzima fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPcase) catalisa a carboxilação primária. O ácido de quatro carbonos resultante flui, através da barreira de difusão, para a região vascular, onde é descarboxilado, liberando CO₂ que é refixado pela rubisco via ciclo de Calvin-Benson (TAIZ; ZEIGER, 2013).

A temperatura elevada pode afetar as plantas em diferentes níveis organizacionais, causando alterações morfológicas, fisiológicas, bioquímicas e na expressão de genes (WAHID et al., 2007). Quando esse estresse acontece na fase vegetativa, pode atrofiar o crescimento da planta, reduzir o teor de pigmentos fotossintéticos, causar necrose principalmente nas pontas das folhas, resultando muitas vezes em senescência e abscisão foliar (GIAVENO; FERRERO 2003).

Fisiologicamente, temperaturas sub-ótimas podem ter efeitos diretos e indiretos na taxa fotossintética (CENTRITTO et al, 2009), na taxa de transpiração (CABUSLAY et al., 2002), no fechamento estomático (SINGH; SENGAR; SENGAR, 2013) e a eficiência do uso da água (CHA-UM; YOOYONGWECH; SUPAIBULWATANA, 2010). Alterações nos parâmetros fotossintéticos das plantas quando submetidas a altas temperaturas, têm demonstrado serem bons indicadores de termotolerância (WAHID et al., 2007).

Em nível bioquímico, o estresse por altas temperaturas pode causar perda na integridade das membranas celulares, desnaturação e inibição da síntese de proteínas, inativação de enzimas e degradação de ácidos nucleicos. Esses danos podem ser atribuídos, em parte, ao aumento do estresse oxidativo, devido a maior produção de espécies reativas de oxigênio (NOCTOR; MHAMDI; FOYER, 2016). Para

para combatê-los, as plantas possuem sistema antioxidante enzimático e não enzimático. A capacidade das plantas de minimizarem os efeitos do estresse oxidativo depende da eficiência do seu sistema antioxidante, o que varia de acordo com a espécie e também entre genótipos (BLOKHINA; VIROLAINEN; FAGERSTEDT, 2003). Em geral, espécies ou genótipos reportados como tolerantes a estresse salino (WALIA et al., 2005), déficit hídrico (MEDICI et al., 2007), frio (KUMAR; LI; PORTIS, 2009) e altas temperaturas (SNIDER et al., 2010) foram aqueles que apresentaram maior resposta antioxidantes quando submetidos ao estresse.

Imediatamente após serem expostas a condições de alta temperatura, as plantas apresentam grandes mudanças em nível molecular, o que inclui alterações na expressão de genes e no acúmulo de transcritos, conduzindo assim a síntese de proteínas relacionadas a tolerância de estresse (IBA, 2002). Nesse sentido a produção de proteínas de choque térmico (*HSPs*) é conhecida como importante estratégia adaptativa das plantas (SAIDI; FINKA; GOLOUBINOFF, 2011).

Para realização de trabalho de expressão de genes é imprescindível que antes se faça a escolha correta dos genes endógenos que são utilizados para cálculo da expressão dos genes de interesses, pois o uso de gene endógeno não validado pode levar a erro na interpretação dos dados (BUSTIN et al., 2009; DERVEAUX; VANDERSOMPELE; HELLEMANS, 2010). Portanto, a confiabilidade dos resultados da expressão do gene é dependente do uso de genes de referência adequados para a cada condição experimental.

O arroz, arroz-vermelho e capim-arroz tendem a ter respostas fisiológicas, bioquímicas e moleculares diferentes quando submetidos a estresses abióticos. Entender as respostas em nível fisiológico destas plantas é desafio fundamental que ainda precisa ser elucidado para melhorar as previsões sobre o efeito das alterações climáticas sobre a produção de arroz, uma vez que esse tipo de estresse não afeta somente a cultura isoladamente, mas também a interação entre a cultura e as plantas daninhas. Desta forma, os objetivos do estudo foram: determinar as respostas fisiológicas e bioquímicas; identificar os genes de referência mais adequados para a normalização para a análise de RT-qPCR; e determinar a expressão dos genes em arroz, arroz-vermelho e capim-arroz quando submetidos a altas temperaturas.

3.2 Material e Métodos

O experimento foi realizado em casa de vegetação pertencente ao Centro de Herbologia/CEHERB da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel/FAEM – Universidade Federal de Pelotas/UFPel, entre os meses de novembro e dezembro de 2014. Em delineamento completamente casualizado, com quatro repetições, sendo conduzido em esquema fatorial. O fator A constou de duas temperaturas (25°C e 40°C) e o fator B de três plantas [arroz (*Oryza sativa* cv. Puitá INTA-CL), arroz-vermelho (*Oryza* spp.) e capim-arroz (*Echinochloa* spp.)].

As unidades experimentais constaram de vasos com capacidade volumétrica de 750 mL, preenchido com solo oriundo de lavoura orizícola, classificado como Planossolo Hidromórfico eutrófico solódico, pertencente à Unidade de Mapeamento Pelotas (EMBRAPA, 2013). As sementes de cada espécie foram semeadas em bandejas contendo substrato comercial GerminaPlant® e as plantas foram transplantadas para as unidades experimentais sete dias após a emergência (DAE).

As plantas foram mantidas durante 30 DAE em casa de vegetação sob mesmas condições de umidade e temperatura, sendo após este período transferidas para pequenas casas de vegetação com controle de temperatura, para que fosse aplicado os tratamentos. As avaliações e coleta de material vegetal foram realizada em quatro épocas distintas (24, 28, 32 e 36 horas após a transferência para casa de vegetação com temperatura diferentes). O horário de cada avaliação foi 7:00, 11:00, 15:00 e 19:00 horas, respectivamente (horário local).

Em cada uma das épocas foram realizadas avaliações fisiológicas relacionadas à fotossíntese líquida (A), condutância estomática (gs), concentração de CO₂ (Ci) e taxa de transpiração (E). Para isso foi utilizado o terço médio da última folha completamente expandida e a avaliação realizada com a utilização do analisador de gases no infravermelho (IRGA), marca LI-COR, modelo LI-6400. Foram calculadas a eficiência da carboxilação (EC), pela relação fotossíntese líquida/concentração de CO₂ subestomática e eficiência do uso da água (EUA) pela relação fotossíntese líquida/taxa de transpiração. A concentração de CO₂ utilizada dentro da câmara foi de 400 $\mu\text{mol mol}^{-1}$, fluxo de fótons de 12000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e o déficit de pressão de vapor (VPD) constante. Em cada época foram também coletadas amostras de tecidos foliares para as análises bioquímicas; enquanto, para a expressão gênica foram

coletadas amostras somente nas avaliações as 28 e 32 horas de tratamento. Os tecidos vegetais foram armazenados a -80°C até o momento das análises.

As análises bioquímicas e moleculares foram realizadas no laboratório do Centro de Herbologia/CEHERB da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel/FAEM. Sendo determinadas a atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e ascorbato peroxidases (APX) e além da quantificação do conteúdo de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), proteínas totais, prolina, clorofila *a* (Cha), clorofila *b* (Chb), clorofila totais (Chtot) e carotenoides (CR).

Para a determinação da atividade das enzimas SOD, CAT e APX primeiramente foi realizada a extração onde 0,2 g de amostra foram maceradas na presença de nitrogênio líquido. Em seguida foram adicionados 900 μL de tampão fosfato 200 mM (pH 7,8), 18 μL de EDTA 10 mM, 180 μL de ácido ascórbico 200 mM e 702 μL de água ultrapura e centrifugado a 12000 *rpm*, a 4°C por 20 minutos. A partir deste extrato foi quantificada o teor de proteínas totais das amostras pelo método de Bradford (1976), onde 60 μL do extrato foram adicionados a 2 mL de solução de Bradford, e realizada leitura da absorbância no comprimento de onda de 595 nm. Os resultados foram calculados em função da curva padrão de caseína e expressos em miligramas de proteína por mL ($\text{mg caseína mL}^{-1}$).

A atividade da SOD foi determinada segundo metodologia adaptada de Giannopolitis and Ries (1977). Por esse método, foi determinada a inibição da redução do NBT (*p*-nitro blue tetrazolium) pelo extrato enzimático evitando assim a formação do cromóforo. Neste ensaio, uma unidade de atividade enzimática (UA) de SOD foi considerada como a quantidade de enzima necessária para obter 50% de inibição da redução do NBT pela SOD contida no extrato enzimático. Para a reação foi adicionado o extrato enzimático em tubo de ensaio contendo 1 mL de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,8), 400 μL de metionina 70 mM, 20 μL de EDTA 10 μM , 390 μL de água ultrapura, 150 μL de NBT 1 mM e 20 μL de riboflavina 0,2 mM. Em seguida os tubos foram incubados em lâmpada fluorescente de 15 Watts durante 10 minutos e em seguida realizada a leitura da absorbância a 560 nm. Para efeito de cálculo, o branco da reação foi considerado como sendo os tubos que não continham extrato, exposto e não exposto à luz, sendo a atividade foi expressa em $\text{UA mg}^{-1} \text{ proteína minuto}^{-1}$.

A atividade da CAT foi determinada segundo metodologia descrita por Azevedo et al. (1998), pelo consumo de H_2O_2 (coeficiente de extinção $39,4 \text{ mM cm}^{-1}$). O extrato

foi adicionado a 1 mL de tampão fosfato de potássio 200 mM (pH 7,0), 850 μ L de água ultrapura, 100 μ L de peróxido de hidrogênio 250 mM. A leitura da absorbância em espectrofotômetro (Ultrospec 6300 Pro UV/Visível – Amersham Bioscience), no comprimento de onda de 240 nm, foi realizada durante 90 segundos com leituras no intervalo de 7 segundos.

A atividade da APX foi determinada segundo metodologia descrita por Azevedo et al. (1998), pelo consumo de H_2O_2 (coeficiente de extinção $2,9 \text{ mM cm}^{-1}$). O extrato foi adicionado a 1 mL de tampão fosfato de potássio 200 mM (pH 7,0), 750 μ L de água ultrapura, 100 μ L de ácido ascórbico 10 mM, 100 μ L de peróxido de hidrogênio. A leitura da absorbância no comprimento de onda de 290 nm foi realizada durante 90 segundos com leituras em intervalos de 7 segundos. Tanto para a atividade da CAT quanto para da APX, para efeito de cálculo, foi considerado que o decréscimo de uma unidade de absorbância é equivalente a uma unidade ativa (UA). As atividades do extrato total foram determinadas pelo cálculo da quantidade de extrato que reduziu a leitura de absorbância em uma UA e expressos em $\text{UA mg}^{-1} \text{ proteína minuto}^{-1}$.

O teor de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), foi determinado conforme descrito por Sergiev, Alexieva e Karanov (1997) e das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), via acúmulo de aldeído malônico (MDA), conforme descrito por Heath e Packer (1968). Para a realização dessas duas análises, 0,2 g de folhas foram macerados com nitrogênio líquido, homogeneizados em 2 mL de ácido tricloroacético (TCA) 0,1% (*m/v*) e centrifugados a 12000 *rpm* por 20 minutos. Para a quantificação de H_2O_2 , alíquotas de 0,2 mL do sobrenadante foram adicionadas em 0,8 mL de tampão fosfato 10 mM (pH 7,0) e 1 mL de iodeto de potássio 1M seguido de agitação em vortex. A solução foi mantida em repouso por 10 minutos em temperatura ambiente e após a absorbância foi lida a 390 nm. A concentração de H_2O_2 foi determinada através de curva padrão com concentrações conhecidas de H_2O_2 e expressa em mM g^{-1} de MF.

Para a determinação de TBARS, alíquotas de 0,5 mL do sobrenadante descrito anteriormente foram adicionadas a 1,5 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,5% (*m/v*) e ácido tricloroacético 10% (*m/v*) e incubadas a 90°C por 20 minutos. A reação foi paralisada em banho de gelo por 10 minutos. Em seguida foi determinada a absorbância a 532 nm, descontando-se a absorbância inespecífica a 600 nm. A concentração de MDA foi calculada utilizando-se o coeficiente de absortividade de 155 mM cm^{-1} e os resultados expressos em nM MDA g^{-1} de MF.

O teor de prolina foi determinado segundo metodologia descrita por Bates, Waldren e Teare (1973), com modificações. Foram macerados 2 g de tecido vegetal em nitrogênio líquido e adicionou-se 2 mL de ácido sulfossalicílico 3% (m/v). Centrifugou-se a 12000 *rpm* por 10 min a temperatura ambiente. Coletou-se 1 mL do sobrenadante no qual adicionou-se 1 mL de ninhidrina ácida (1,25 g de ninhidrina; 30 ml de ácido acético glacial; 20 ml de ácido fosfórico 6M) e 1 mL de ácido acético glacial. Incubou-se a 95 graus por 1 hora e em seguida resfriou-se em banho de gelo por 10 minutos. Acrescentou-se 3 mL de tolueno, agitou-se em vortex e coletou-se o sobrenadante da amostra para leitura da absorbância a 520 nm. Os resultados foram expressos em μmol de prolina g^{-1} MF, através da elaboração de curva padrão de prolina com concentrações conhecidas.

Os teores de clorofilas e de carotenoides totais foram determinados segundo metodologia descrita por Arnon (1949), como modificações. Amostras de 0,1 g foram maceradas em almofariz em presença de 5 mL de acetona a 80% (v/v). O material foi centrifugado a 12.000 *rpm* por 10 minutos, completando-se o volume para 20 mL com acetona a 80% (v/v). Os teores de clorofila *a*, *b*, totais e carotenoides totais foram calculados pelo uso das fórmulas de Lichtenthaler (1987) a partir da absorbância da solução obtida por espectrofotometria a 647, 663 e 470 nm, sendo os resultados expressos em mg g^{-1} de massa fresca (MF).

Para determinação da expressão gênica, o RNA foi extraído do tecido vegetal usando o reagente PureLink™ (Plant RNA Reagent – Invitrogen™), seguindo as recomendações do fabricante. A qualidade e quantidade desse RNA foi determinada com uso de espectrofotômetro NanoDrop™ 2000 (Thermo Scientific), onde a razão das leituras no comprimento de onda 260/280nm devia-se manter entre 1,9 a 2,2 e a razão 260/230 em torno de 2.0. A qualidade do RNA foi confirmada em eletroforese e em gel de agarose (1%). O cDNA foi construído usando kit comercial SuperScript First-Strand system for RT-qPCR (Invitrogen™), de acordo com as recomendações do fabricante.

Para genes de referência foram selecionados sete pares de primers usados como controle interno em outros estudos de estresse abióticos em arroz e que suspostamente não mostram variação em diferentes tratamentos (Tabela 1). Realizou-se a reação de amplificação usando o volume total de 12 μL , contendo 6,25 μL de LightCycler® 480 SYBR Green I Master (Roche Applied Science); 0,5 μL de primer (10 mM); 1 μL de cDNA (0.2 μg) e 4,25 μL de água. As condições de

amplificação foram as seguintes: um ciclo a 95°C (5 minutos); 45 ciclos de desnaturação a 95°C (20 segundos); 60°C (60 segundos); e, 72°C (20 segundos). O processo foi finalizado pela curva de dissociação com a desnaturação a 95°C (5 segundos), resfriamento a 70°C (1 minuto), gradual aquecimento de 0,11°C steps até 95°C (5 segundos), e resfriamento 40°C (30 segundos). O RT-qPCR foi realizado no equipamento LightCycler 480 systems (Roche Applied Science). Todas as reações foram em triplicata para cada amostra de cDNA, e a pureza do amplicon foi assumida quando produzido um único pico de fusão.

A eficiência do PCR foi obtida através da análise de quatro diluições seriais do cDNA (1:1, 1:5, 1:25 e 1:125), para gerar a curva padrão de cada par de primer testados. O valor de E foi estimado pela equação $E = 10^{(-1/\text{slope})}$ (Rasmussen, 2001), sendo considerado aceitável valores entre 1,8 e 2,2, para os genes referência e alvo (Tabela 17).

Para os genes referência com eficiência dentro do padrão aceitável, determinou-se a classificação e determinação do desempenho de cada gene a partir da média dos valores de Ct para cada amostra testada, obtido através de cada ciclo de reação de RT-qPCR. Esses dados foram submetidos a análise de variância e foram considerados estáveis aqueles genes normalizadores com menores valores de desvio padrão e coeficiente de variação. Paralelamente, foram observadas alterações nos níveis de expressão nas amostras, utilizando a ferramenta baseada na web RefFinder (XIE et al., 2012), que integra quatro algoritmos de software, método comparativo delta-Ct, BestKeeper, NormFinder e GeNorm. O valor médio do Ct de cada amostra para cada primer foi utilizado como dados de entrada no website, sendo analisado o valor de Ct das três espécies em conjunto.

Após a escolha do gene referência mais adequado, foi realizada a análise da expressão dos genes alvo (*OsAPX2*; *OsHsp24.15*; e, *OsHsp71.10*) nas mesmas condições do PCR descritas anteriormente. Para a quantificação relativa dos genes, realizou-se o cálculo de expressão relativa através do método $\Delta\Delta\text{Ct}$, pela equação $\Delta\Delta\text{Ct} = (\text{Ct}_{\text{alvo}} - \text{Ct}_{\text{endogeno}}) - (\text{Ct}_{\text{calibrador}} - \text{Ct}_{\text{endogeno}})$, sendo o $\Delta\Delta\text{Ct}$ a expressão relativa do gene e o calibrador o tratamento arroz a 25°C, e a aplicação do resultado em $2^{-(\Delta\Delta\text{Ct})}$ forneceu a dimensão de variação.

Os dados do estudo foram analisados quanto à normalidade e homocedasticidade e posteriormente submetidos a análise de variância ($p \leq 0,05$). Em sendo constatada significância estatística, o efeito de espécie foi avaliado pelo teste

de Duncan ($p \leq 0,05$) e o efeito de temperatura pelo teste t ($p \leq 0,05$). A presença de correlação entre as variáveis fisiológicas e bioquímicas do estudo foi analisada através do coeficiente de correlação de Pearson ($p \leq 0,05$) separadamente para cada coleta. O qual mede o grau da correlação entre duas variáveis. O coeficiente de correlação Pearson® varia de -1 a 1, o sinal indica direção positiva ou negativa do relacionamento e o valor sugere a força entre as variáveis.

Tabela 17 - Primes utilizados para RT-qPCR em arroz, arroz-vermelho e capim-arroz submetidos a temperaturas de 25°C e 40°. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2014.

Genes	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')	Eficiência		
			Arroz	Arroz-vermelho	Capim-arroz
<i>OsACT11</i> (ZHANG; HU, 2009)	CAGCCACACTGTCCCCATCTA	AGCAAGGTCGAGACGAAGGA	2,33	2,31	1,74
<i>Osβ-Tubulina</i> (ZHANG; HU, 2009)	GCTGACCACACCTAGCTTTGG	AGGGAACCTTAGGCAGCATGT	2,20	2,20	1,82
<i>OsUBC-E2</i> (JAIN et al., 2006)	CCGTTTGTAGAGCCATAATTGCA	AGGTTGCCTGAGTCACAGTTAAGTG	2,15	2,20	2,18
<i>OsEIF-4a</i> (JAIN et al., 2006)	TTGTGCTGGATGAAGCTGATG	GGAAGGAGCTGGAAGATATCATAGA	2,04	2,16	2,20
<i>OsUBQ10</i> (JAIN et al., 2006)	ACCACTTCGACCGCCACTACT	ACGCCTAAGCCTGCTGGTT	2,48	2,14	2,29
<i>OsGAPDH</i> (JAIN et al., 2006)	AAGCCAGCATCCTATGATCAGATT	CGTAACCCAGAATACCCTTGAGTTT	2,19	2,36	1,90
<i>Os18SrRNA</i> (JAIN et al., 2006)	CTACGTCCCTGCCCTTTGTACA	GCAACAAGGTCAATCCGATC	2,17	2,17	2,18
<i>OsAPX2</i> (ZHANG; LU; ZHANG, 2014)	AGAGTCAGTACGATCAAGAC	TCTTGACAGCAAATAGCTTGG	2,11	2,17	2,20
<i>OsHsp24.15</i> (YE et al., 2012)	GATCAAGGCGGAGATGAAGAAC	ACTCGACGTTGACCTGGAAGA	2,08	1,98	2,20
<i>OsHsp71.10</i> (YE et al., 2012)	CCGTGTGCTTCGACATTGAC	CGTTGGTGATGGTGATCTTGTT	2,09	2,07	2,04

3.3 Resultados e Discussão

Para as variáveis fotossintéticas verificou-se que na avaliação realizada as 24 horas de tratamento não houve interação entre os fatores testados para nenhuma das variáveis analisadas, observando-se apenas efeito simples do fator espécie para as variáveis A , C_i , EC e EUA (Tabela 18), para g_s e E não se verificou efeito dos fatores de tratamento. Nesta primeira avaliação foi observado que o capim-arroz teve a maior A , sendo que o arroz apresentou aproximadamente a metade da A verificada nas plantas de capim-arroz (Tabela 18). A C_i foi maior em arroz e arroz-vermelho que no capim-arroz; enquanto, EC e EUA foi menor nas espécies C_3 que na C_4 testada (Tabela 18).

Tabela 18 - Fotossíntese líquida (A), concentração de CO_2 subestomática (C_i), eficiência da carboxilação (EC), eficiência do uso de água (EUA) de plantas de arroz, arroz-vermelho e capim-arroz expostas a 24 horas de tratamento. FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2014.

	Arroz	Arroz-vermelho	Capim-arroz	CV (%)
A $\mu\text{mol } CO_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$	16,34 c ¹	21,76 b	32,32 a	21,60
C_i	307,88 a	281,29 a	77,38 b	23,53
EC $\text{mol } CO_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-2}$	0,05 b	0,11 b	1,50 a	72,23
EUA $\mu\text{mol } CO_2 [\text{mmol } H_2O]^{-1}$	3,62 b	5,66 b	18,03 a	65,82

¹médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha, não diferem pelo teste Duncan ($p \leq 0,05$).

Na avaliação realizada as 28 horas verificou-se interação entre os fatores para as variáveis A , g_s , C_i e EUA (Tabela 19), efeito simples de temperatura e espécie para E e EC (Tabela 20 e 21). O arroz e arroz-vermelho não tiveram a A afetada pela mudança de temperatura nessa época de avaliação; enquanto, o capim-arroz aumentou A quando mantido na temperatura de 40°C em relação a 25°C (Tabela 19). O capim-arroz apresentou maior A nas duas temperaturas testadas, já, o arroz teve a menor A , diferindo do arroz-vermelho na temperatura a de 40°C. As três espécies testadas reduziram a g_s quando submetidas a maior temperatura. Na temperatura de 25°C a maior g_s foi observada no arroz, já na temperatura 40°C o arroz teve menor

gs, e o capim-arroz a maior, sendo que o arroz-vermelho não diferiu das outras espécies.

Tabela 19 - Fotossíntese líquida (A), condutância estomática (gs) concentração de CO₂ subestomática (Ci), eficiência da carboxilação (EC) e eficiência do uso de água (EUA) de plantas de arroz, arroz-vermelho e capim-arroz submetidas a temperaturas de 25°C e 40°C as 28 horas de tratamento. FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2014.

Plantas	Arroz		Arroz-vermelho		Capim-arroz		CV(%)
A ($\mu\text{ mol CO}_2\text{ m}^{-2}\text{ s}^{-1}$)							
25°C	23,46	^{ns1} b ²	21,10	^{ns} b	33,28	* a	14,41
40°C	24,42	b	21,74	c	39,07	a	
gs (mol H ₂ O m ⁻² s ⁻¹)							
25°C	0,47	* a	0,30	* b	0,30	* b	20,73
40°C	0,14	b	0,19	ab	0,22	a	
Ci							
25°C	285,37	^{ns} a	280,14	* a	142,50	^{ns} b	5,50
40°C	275,55	a	253,50	b	126,05	c	
EUA ($\mu\text{mol CO}_2\text{ [mmol H}_2\text{O]}^{-1}$)							
25°C	2,33	^{ns} b	2,36	* b	5,34	^{ns} a	9,11
40°C	2,48	c	3,02	b	5,97	a	

¹ * ou ^{ns} médias diferem ou não entre as temperaturas, dentro de cada variável, pelo teste t ($p \leq 0,05$).

² médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha não diferem pelo teste Duncan ($p \leq 0,05$).

O arroz-vermelho foi única espécie que teve a Ci e EUA afetadas pela mudança de temperatura, sendo observado redução na Ci e aumento no EUA quando as plantas foram mantidas a 40°C, em comparação a 25°C (Tabela 19). Quando em 25°C constatou-se que o arroz e arroz-vermelho tiveram maior Ci que o capim-arroz; enquanto, em 40°C o arroz apresentou maior Ci, seguido pelo arroz-vermelho. Quanto à EUA o capim-arroz foi superior em ambas as temperaturas testadas; porém, o arroz e arroz-vermelho diferiram na temperatura de 40°C, sendo a cultura menos eficiente que a plantas daninhas.

A E e EC das espécies testadas foram reduzidas quando estas estavam em alta temperatura, na avaliação realizada as 28 horas de tratamento (Tabela 20). Plantas de arroz apresentaram maior E que as plantas daninhas, já, o capim-arroz por ser C4 teve maior EC que as demais espécies testadas (Tabela 21).

Tabela 20 - Média da Evapotranspiração (E) e eficiência de carboxilação (EC) em plantas de arroz, arroz-vermelho e capim-arroz submetidas a temperaturas de 25°C e 40°C as 28 horas de tratamento. FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2014.

	25°C	40°C	CV (%)
E (mmol H ₂ O m ⁻² s ⁻¹)	4,39 * ¹	3,03	18,85
EC (μ μmol CO ₂ m ⁻² s ⁻¹)	0,65 *	0,08	18,64

¹ * ou ^{ns} médias diferem ou não entre as temperaturas testadas pelo teste t (p ≤ 0.05).

Tabela 21 - Evapotranspiração (E) e eficiência de carboxilação (EC) em plantas de arroz, arroz-vermelho e capim-arroz expostas a 28 horas de tratamento. FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2014.

	Arroz	Arroz-vermelho	Capim-arroz	CV (%)
E (mmol H ₂ O m ⁻² s ⁻¹)	4,85 a ¹	4,60 a	1,87 b	15,63
EC (μ μmol CO ₂ m ⁻² s ⁻¹)	0,05 b	0,11 b	1,50 a	32,24

¹ médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha, não diferem pelo teste Duncan (p ≤ 0,05).

Na avaliação realizada às 32 horas após os tratamentos verificou-se interação para todos os parâmetros fotossintéticos analisados (Tabela 22). Observou-se que o arroz e arroz-vermelho reduziram a A , g_s , C_i e E , quando submetidos ao aumento de temperatura, por outro lado, a EUA aumentou nestas duas espécies nesta situação. A E foi a única variável que apresentou aumento nas plantas de capim-arroz que estavam a 40°C. Nenhuma das três espécies testadas tiveram a EC afetada pela temperatura do ambiente.

Às 32 horas em ambas as temperaturas o arroz e arroz-vermelho tiveram menor A e maior g_s e C_i que o capim-arroz; porém, a 25°C o arroz-vermelho teve maior C_i que o arroz (Tabela 22). Na temperatura de 25°C as plantas C3 tiveram maior E que a C4; contudo, na temperatura de 40°C o arroz-vermelho apresentou maior E , o arroz a menor e o capim-arroz não diferiu das outras espécies. A , EC e EUA foi maior em capim-arroz que nas demais espécies em ambas as temperaturas, sendo que o arroz e arroz-vermelho diferiram na EC quando submetidos ao tratamento de 40°C, onde a cultura teve menor EC que a planta daninha.

Tabela 22 - Fotossíntese líquida (A), condutância estomática (gs) concentração de CO₂ subestomática (Ci), evapotranspiração (E), eficiência da carboxilação (EC) e eficiência do uso de água (EUA) em plantas de arroz, arroz-vermelho e capim-arroz submetidas a temperaturas de 25°C e 40°C as 32 horas de tratamento. FAEM/UFPEL, Capão do Leão/RS, 2014.

Plantas	Arroz		Arroz-vermelho		Capim-arroz		CV(%)
A (μ μmol CO ₂ m ⁻² s ⁻¹)							
25°C	24,72	* ¹ b ²	29,00	* b	53,55	^{ns} a	13,66
40°C	20,01	b	19,26	b	49,55	a	
gs (mol H ₂ O m ⁻² s ⁻¹)							
25°C	0,18	* a	0,15	* a	0,05	^{ns} b	18,74
40°C	0,10	a	0,10	a	0,06	b	
Ci							
25°C	168,00	* b	233,41	* a	122,90	^{ns} c	8,19
40°C	141,85	a	144,13	a	122,21	b	
E (mmol H ₂ O m ⁻² s ⁻¹)							
25°C	4,22	* a	4,36	* a	1,34	* b	17,21
40°C	1,32	b	2,33	a	1,88	ab	
EC							
25°C	0,15	^{ns} b	0,12	^{ns} b	1,71	^{ns} a	23,37
40°C	0,14	c	0,16	b	1,27	a	
EUA (μmol CO ₂ [mmol H ₂ O] ⁻¹)							
25°C	5,94	* b	7,91	* b	25,46	^{ns} a	19,59
40°C	14,39	b	11,61	b	28,33	a	

^{1/} * ou ^{ns} médias diferem ou não entre as temperaturas, dentro de cada variável, pelo teste t ($p \leq 0.05$).

^{2/} médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha, não diferem significativamente pelo teste de Duncan ($p \leq 0,05$).

Na avaliação às 36 horas observou-se interação entre os fatores para as variáveis gs e E (Tabela 23); e, efeito simples de espécie para A, Ci, EC e EUA (Tabela 24). O arroz reduziu a gs quando submetido a temperatura alta, as plantas daninhas não tiveram a gs afetada pela temperatura nessa época de avaliação (Tabela 23). Arroz e arroz-vermelho reduziram a E no tratamento a 40°C, o capim-arroz não alterou a E nos tratamentos com diferentes temperaturas.

Na temperatura de 25°C as plantas de arroz apresentaram maior gs e as de capim-arroz a menor; contudo, a 40°C a maior gs foi verificada em plantas de arroz-vermelho e o arroz e capim-arroz não diferiram entre si (Tabela 23). Tanto em 25°C quanto em 40°C o arroz e arroz-vermelho tiveram maior E que o capim-arroz (Tabela 23). As 36 horas de tratamento, como nas demais épocas de avaliação, verificou-se que o arroz e arroz-vermelho tiveram menor A, EC e EUA; e, maior Ci que o capim-arroz (Tabela 24).

Tabela 23 - Condutância estomática (*gs*) e evapotranspiração (*E*) em plantas de arroz, arroz-vermelho e capim-arroz submetidas a temperaturas de 25°C e 40°C as 36 horas de tratamento. FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2014.

Plantas	Arroz		Arroz-vermelho		Capim-arroz		CV(%)
gs (mol H ₂ O m ⁻² s ⁻¹)							
25°C	0,20	* ¹ a ²	0,17	^{ns} b	0,04	^{ns} c	15,33
40°C	0,04	b	0,15	a	0,08	b	
E (mmol H ₂ O m ⁻² s ⁻¹)							
25°C	4,25	* a	4,41	* a	1,95	^{ns} b	20,81
40°C	3,07	a	3,26	a	2,37	b	

¹ * ou ^{ns} medias diferem ou não entre as temperaturas, dentro de cada variável, pelo teste t (p≤ 0.05).

² médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha, não diferem significativamente pelo teste de Duncan (p≤0,05).

Tabela 24 - Fotossíntese líquida (*A*), concentração de CO₂ subestomática (*Ci*), eficiência da carboxilação (*EC*) e eficiência do uso de água (*EUA*) em plantas de arroz, arroz-vermelho e capim-arroz as 36 horas de tratamento. FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2014.

	Arroz		Arroz-vermelho		Capim-arroz		CV (%)
<i>A</i> (μmol CO ₂ m ⁻² s ⁻¹)	22,47	b ¹	25,47	b	48,88	a	20,73
<i>Ci</i>	120,92	a	118,17	a	60,95	b	21,48
<i>EC</i> (μmol CO ₂ m ⁻² s ⁻¹)	0,15	b	0,19	b	1,79	a	29,93
<i>EUA</i> (μmol CO ₂ [mmol H ₂ O] ⁻¹)	4,62	b	4,65	b	12,56	a	32,22

¹ médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha, não diferem pelo teste Duncan (p≤0,05)

Tanto as 28 quanto as 32 horas de tratamento verificou-se comportamento fotossintético semelhante nas plantas de arroz e arroz vermelho, sendo que temperaturas elevadas resultaram em redução na *A*. A temperatura do ar afeta diretamente a temperatura da folha, sendo que a temperatura foliar pode ser até 15°C mais alta que a temperatura do ambiente; porém, plantas C3 tem a fotossíntese fortemente inibida quando a temperatura foliar supera os 38°C (GOVINDJEE, 1995), a temperatura média ideal para o crescimento e desenvolvimento do arroz na fase vegetativa é de 25°C, sendo que a temperatura máxima suportada pela cultura é de 45°C (YOSHIDA, 1981).

A redução média de *A* foi de 20 e 33% para arroz e arroz-vermelho, respectivamente (Tabela 22), trabalhos anteriores mostraram que plantas de arroz e trigo submetidas a temperaturas supra ótimas na fase vegetativa, reduziram a taxa fotossintética, resultando na redução da produção de fotoassimilados e consequentemente na menor produção de biomassa (WAHID et al., 2007;

BARNABAS; JAGER; FEHER, 2008), sendo evidenciadas em trigo submetido a estresse térmico reduções de 48% na fotossíntese líquida (HASSAN, 2006; SHAH; PAULSEN, 2003).

Mesmo sem danos celulares espera-se em plantas C3, submetidas a altas temperaturas, redução na fotossíntese, pois a fotorrespiração aumenta em temperaturas elevadas (KAISER et al., 2015), sendo esse aumento proveniente da redução da solubilidade do CO₂ em relação ao O₂ nos tecidos foliares, o que resulta em menor disponibilidade de CO₂ no sítio ativo da rubisco (WAHID et al., 2007). A fotorrespiração, é relatada como um processo evolutivo das plantas C3, que visa não apenas reduzir a perda de carbono em ambientes com baixa relação CO₂:O₂, mas também reduzir a fotoinibição do aparato fotossintético pelo excesso de redutores formados nos cloroplastos em plantas submetidas a temperatura subótimas.

A modificação de *A* observadas nas plantas C3 em resposta ao aumento da temperatura, pode ser atribuída tanto a fatores estomáticos como não estomáticos, e estes processos tem grande variação entre espécies (SAIBO; LOURENÇO; OLIVEIRA, 2009). Em casos de estresses mais severos, a fotossíntese é inibida devido a danos fotossistema II (PSII), que é o componente fotossintético mais sensível ao estresse térmico (SCHRADER et al., 2004).

Nas plantas de arroz e arroz-vermelho analisadas verificou-se fechamento estômático quando essas foram expostas a temperatura subótima, pois ocorreu a redução da *gs*. O controle estômático é importante propriedade fisiológica por meio da qual as plantas limitam a perda de água, ocasionando modificações na condutância estômática e, geralmente, afetando as trocas gasosas como forma de resposta das plantas a diversos fatores, incluindo o estresse (PAIVA et al., 2005). A redução da abertura estômática ocasionou redução na *E*, sendo que redução apenas parcial da abertura estômática limita mais a evapotranspiração do que a entrada de CO₂ pelos estômatos (FIRMANO; KUWAHARA; SOUZA, 2009).

Redução da evapotranspiração causa aumento na temperatura foliar, pois um dos mecanismos das plantas para dissipação de energia é a perda de calor latente por meio da evaporação de água. O fechamento estômático é um típico comportamento de plantas submetidas a temperaturas supostamente moderadas, ou seja, entre 30-40°C (SHARKEY, 2005). Plantas de trigo e cevada apresentaram redução de 34 a 64% na *gs* quando submetidas a temperaturas de 40°C (ROLLINS et al., 2013; SHAH; PAUSEN, 2003).

A redução g_s além da E , afeta a C_i que tende a diminuir, pois menos CO_2 atinge a cavidade subestomática, a redução da C_i também aponta que apesar da diminuição da fotossíntese observada no tratamento de 40°C a rubisco continua fixando pelo menos em parte CO_2 , pois caso contrário o CO_2 se acumularia na cavidade subestomática. Por sua vez, a redução na E resulta muitas vezes no aumento da EUA, pois menor quantidade de água é evapotranspirada para a produção de certa quantidade de massa da matéria seca (SILVA; SILVA, 2007), o que aponta, novamente, que a temperatura de 40°C causou estresse térmico moderado nas plantas de arroz e arroz-vermelho, uma vez que estresses moderados causam a supressão da condutância do mesófilo e o fechamento estomático (CHAVES et al., 2009), em caso de estresse severos as plantas aumentam a E visando o esfriamento foliar, além disso, o estresse severo causa forte redução da taxa fotossintética resultando na diminuição da EUA.

A eficiência da carboxilação foi reduzida nas plantas C3 submetidas à temperatura de 40°C , de modo semelhante ao verificado nas demais variáveis. Tais resultados são decorrentes das alterações na fotossíntese líquida e na concentração de CO_2 subestomático.

Pode-se observar que o aumento da temperatura não causou grandes efeitos nas variáveis fotossintéticas das plantas de capim-arroz; e como esperado, o capim-arroz apresentou menor g_s , E e maior EUA e EC que o arroz e o arroz-vermelho, essas repostas são características inerentes de plantas com rotas fotossintéticas distintas (TAYLOR et al., 2010). A temperatura elevada reduz a capacidade de carboxilação da rubisco e também a solubilidade de CO_2 , limitando assim a taxa de assimilação fotossintética de CO_2 em plantas C3, contudo em plantas C4 como o capim-arroz, duas características se sobressaem ao efeito deletério da temperatura alta. A primeira delas é que a afinidade da PEPcase por seu substrato, HCO_3^- , é suficientemente alta para saturar a enzima nos níveis de CO_2 presente em climas quentes. Essa alta atividade da PEPcase permite às plantas C4, reduzirem sua abertura estomática e, assim, conservar água, enquanto fixa CO_2 em taxas iguais ou maiores que as plantas C3; a segunda característica é devida a alta concentração de CO_2 nas células da bainha do feixe vascular que minimiza a fotorrespiração (MAROCCO et al., 1998). Por permitir uma fotossíntese mais eficiente, essas características dão às plantas C4 vantagem competitiva em ambientes nos quais os

custos de fotorrespiração são importantes, como quando as plantas se desenvolvem em temperaturas subótimas.

Tabela 25 - Teor de proteína totais, atividade das enzimas catalase (CAT) e ascorbato peroxidase (APX), teor de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), clorofila a (Cha), clorofila b (Chb) e clorofilas totais e carotenoides (CR) em plantas de arroz, arroz-vermelho e capim-arroz as 24 horas de tratamento. FAEM/UFPeL, Capão do Leão/RS, 2014.

	Arroz	Arroz-vermelho	Capim-arroz	CV (%)
Proteína (mg caseína g ⁻¹ MF)	15,49 a ¹	14,83 a	4,34 b	20,10
CAT (UA mg ⁻¹ prot. min ⁻¹)	0,11 a	0,11 a	0,05 b	34,19
APX (UA mg ⁻¹ prot. min ⁻¹)	0,51 a	0,48 a	0,27 b	58,03
H ₂ O ₂ (mM g ⁻¹ MF)	12,10 a	9,80 b	5,70 c	12,43
TBARS (nM MDA g ⁻¹ de MF)	18,89 a	18,60 a	14,64 b	20,10
Cha (mg g ⁻¹ MF)	1,69 a	1,35 b	1,20 b	16,15
Chb (mg g ⁻¹ MF)	0,70 a	0,63 b	0,50 b	21,62
Chtot (mg g ⁻¹ MF)	2,45 a	2,23 a	1,64 b	21,62
CR (mg g ⁻¹ MF)	0,54 a	0,50 a	0,30 b	25,45

¹ médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha, não diferem pelo teste Duncan ($p \leq 0,05$). MF= massa fresca, UA= unidade ativa, MDA= aldeído malônico.

Observou-se que o arroz e arroz-vermelho apresentaram maior concentração de proteínas, atividade da CAT e APX, conteúdo de H_2O_2 , TBARS, Chtot e CR que o capim-arroz; enquanto, que o arroz teve maior conteúdo de H_2O_2 que o arroz-vermelho (Tabela 25). A cultura teve maior concentração dos pigmentos Cha e Chb que as plantas daninhas, as quais não diferiram quanto ao teor desses pigmentos nessa época de avaliação.

Na avaliação realizada às 28 horas observou-se interação entre os fatores de tratamento para as variáveis teor de proteína, atividade das enzimas SOD, CAT e APX, teor de H_2O_2 , TBARS, Cha, Chb e Chtot (Tabela 26), não houve efeito dos fatores de tratamento nas variáveis teor de prolina e CR. O arroz-vermelho apresentou redução no teor de proteína em suas folhas quando submetido a alta temperatura; o capim-arroz aumentou; e, o arroz não teve a variável alterada (Tabela 26). Em ambas

as temperaturas testadas o arroz apresentou mais proteína seguido pelo arroz-vermelho.

Tabela 26 - Teor de proteína totais, atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX), teor de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), clorofila a (Cha), clorofila b (Chb) e clorofilas totais em plantas de arroz, arroz-vermelho e capim-arroz submetidas a temperaturas de 25°C e 40°C as 28 horas de tratamento. FAEM/UFPeL, Capão do Leão/RS, 2014.

	Arroz		Arroz-vermelho		Capim-arroz	CV (%)
Proteína (mg caseína g ⁻¹ MF)						
25°C	19,47 ^{ns1}	a ²	14,81 [*]	b	3,43 [*]	c
40°C	19,50	a	11,11	b	4,90	c
SOD (UA mg ⁻¹ prot. min ⁻¹)						
25°C	3,96 ^{ns}	b	4,73 ^{ns}	b	17,17 [*]	a
40°C	5,63	ns	5,08		4,00	
CAT (UA mg ⁻¹ prot. min ⁻¹)						
25°C	0,12 [*]	a	0,11 ^{ns}	a	0,05 ^{ns}	b
40°C	0,18	a	0,11	b	0,03	c
APX (UA mg ⁻¹ prot. min ⁻¹)						
25°C	0,43 [*]	a	0,45 [*]	a	0,32 [*]	b
40°C	1,00	a	1,82	a	0,11	b
H ₂ O ₂ (mM g ⁻¹ MF)						
25°C	8,18 [*]	a	7,81 [*]	a	4,36 ^{ns}	b
40°C	11,09	a	10,48	a	4,97	b
TBARS (nM MD ³ g ⁻¹ MF)						
25°C	17,82 [*]	a	14,17 ^{ns}	b	14,82 ^{ns}	b
40°C	20,34	a	13,48	b	13,82	b
Cha (mg g ⁻¹ MF)						
25°C	1,67 ^{ns}	a	1,22 [*]	b	0,87 ^{ns}	c
40°C	1,90	a	0,94	b	0,84	b
Chb (mg g ⁻¹ MF)						
25°C	0,60 ^{ns}	a	0,56 [*]	a	0,41 ^{ns}	b
40°C	0,63	a	0,45	b	0,42	b
Cht (mg g ⁻¹ MF)						
25°C	2,48 ^{ns}	a	1,68 [*]	b	1,28 ^{ns}	c
40°C	2,69	a	1,27	b	1,08	b

¹ * ou ^{ns} médias diferem ou não entre as temperaturas, dentro de cada variável, pelo teste t (p ≤ 0,05).

² médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha, não diferem pelo teste de Duncan (p ≤ 0,05).

³ MF= massa fresca, ^{3/} UA= unidade ativa. ⁴ MDA= aldeído malônico.

O capim-arroz foi a única espécie que teve a atividade da SOD modificada, sendo reduzida em plantas submetidas a alta temperatura (Tabela 26). Entre espécies, quando submetidas ao tratamento a 25°C, o capim-arroz teve maior atividade da SOD que arroz ou arroz-vermelho, enquanto, no tratamento a 40°C as

espécies não diferiram quanto a atividade dessa enzima. O arroz aumentou a atividade da enzima CAT nas plantas submetidas a 40°C; enquanto, as plantas daninhas não tiveram a atividade da CAT afetada pela diferença de temperatura. Em ambas as temperaturas testadas o arroz apresentou a maior atividade da CAT, sendo que na temperatura de 25°C não diferiu do arroz-vermelho.

As três espécies testadas tiveram a atividade da enzima APX influenciada pela temperatura, sendo que para arroz e arroz-vermelho houve aumento e para o capim-arroz redução na atividade da enzima, quando submetidas a 40°C em relação a 25°C (Figura 26). O arroz e o arroz-vermelho tiveram maior atividade da APX que o capim-arroz nas duas temperaturas testadas.

A concentração de H₂O₂ nas plantas de arroz e arroz-vermelho aumentou quando estas estavam a 40°C comparativamente a 25°C; já, o capim-arroz não teve a concentração de H₂O₂ foliar afetada pela temperatura do ambiente nesta avaliação (Tabela 26). As espécies C3 apresentaram maior concentração de H₂O₂ em seus tecidos que a C4, em ambas as temperaturas.

O arroz aumentou a concentração de TBARS quando submetido ao aumento de temperatura; já, as plantas daninhas não modificaram a concentração de TBARS nessa situação (Figura 26). Nas duas temperaturas testadas o arroz teve maior concentração de TBARS que as plantas daninhas. O arroz-vermelho reduziu o teor de Cha, Chb e Chtot quando submetido ao tratamento a 40°C e o arroz e o capim-arroz não tiveram a concentração de pigmentos fotossintéticos afetadas pela temperatura. O arroz apresentou maior teor dos pigmentos fotossintetizantes das três espécies testadas, não diferindo do arroz-vermelho no teor de Chb quando submetidos a 25°C. O arroz-vermelho e capim-arroz não diferiram quanto ao teor de Cha, Chb e Chtot no tratamento a 40°C.

Na avaliação realizada às 32 horas de tratamento verificou-se interação entre os fatores para as variáveis teor de proteína, atividade da SOD e APX, teor de H₂O₂ e Chb (Tabela 27); efeito simples do fator temperatura foi observado para as variáveis teor Cha e Chtot (Tabela 28); efeito simples de espécies nas variáveis atividade da CAT, TBARS, prolina, Cha e Chtot (Tabela 29); e, não foi observando efeito dos fatores de tratamento para a variável teor CR.

Tabela 27 - Teor de proteínas totais, atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX), peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e teor de clorofilas b (Chb) em plantas de arroz, arroz-vermelho e capim-arroz submetidas a temperaturas de 25°C e 40°C as 32 horas de tratamento. FAEM/UFPEL, Capão do Leão/RS, 2014.

Plantas	Arroz		Arroz-vermelho		Capim-arroz		CV (%)
Proteína totais (mg caseína g ⁻¹ MF)							
25°C	16,96	^{*1} a ²	16,61	[*] a	4,16	^{ns} b	22,67
40°C	12,29	a	9,98	b	4,29	c	
SOD (UA mg ⁻¹ prot. min ⁻¹)							
25°C	2,87	[*] b	2,30	[*] b	8,93	[*] a	25,02
40°C	5,08	^{ns3}	5,47		3,10		
APX (UA mg ⁻¹ prot. min ⁻¹)							
25°C	0,41	[*] ns	0,45	[*]	0,39	^{ns}	27,04
40°C	1,63	a	1,67	a	0,19	b	
H ₂ O ₂ (mM g ⁻¹ MF)							
25°C	7,88	[*] a	7,04	[*] a	4,97	^{ns} b	21,17
40°C	13,66	a	13,08	a	4,60	b	
Chb (mg g ⁻¹ MF)							
25°C	0,63	^{ns} a	0,65	[*] a	0,28	[*] b	13,55
40°C	0,59	a	0,53	a	0,48	b	

¹ * ou ^{ns} médias diferem ou não entre as temperaturas testadas, dentro de cada variável, pelo teste t (p ≤ 0.05). ² médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha não diferem pelo teste Duncan (p ≤ 0,05). ³ ns = não significativo. MF = massa fresca, UA = unidade ativa.

Plantas de arroz e arroz-vermelho reduziram a concentração de proteínas no tecido foliar quando submetidas a alta temperatura; porém, o capim-arroz não apresentou mudanças na concentração desse composto nas diferentes temperaturas (Tabela 27). Em ambos os tratamentos de temperatura o arroz apresentou os maiores níveis de proteínas e o capim-arroz os menores (Figura 27).

As três plantas modificaram a atividade da SOD quando expostas a diferentes temperaturas, sendo que o arroz e arroz-vermelho aumentaram a atividade da enzima quando em temperatura mais elevada; já, o capim-arroz reduziu a atividade dessa enzima antioxidante nessa situação (Tabela 27). Na temperatura de 25°C, das três espécies testadas, o capim-arroz teve a maior atividade da SOD; porém, quando submetidas a 40°C às plantas não diferiram quanto a atividade dessa enzima.

Assim como na avaliação anterior as plantas C3 testadas aumentaram a atividade da enzima APX e o teor de H₂O₂ quando exposta a alta temperatura; enquanto, o capim-arroz não teve alterações nessas variáveis quando exposto a diferentes temperaturas (Tabela 27). Quando submetidas a 25°C as três espécies não diferiram quanto a atividade da APX; já, na temperatura mais elevada o arroz e arroz-

vermelho tiveram maior atividade da APX que o capim-arroz. Quanto ao teor de H_2O_2 em ambas as temperaturas o arroz e arroz-vermelho apresentaram maior concentração dessa EROs que o capim-arroz; observando-se aumento de 42 e 49 % nos tecidos de arroz e arroz-vermelho quando submetidos a 40°C.

A temperatura do ambiente não alterou a Chb do arroz; para o arroz-vermelho verificou-se redução com aumento da temperatura; e, para o capim-arroz constatou-se aumentou com o aumento da temperatura (Tabela 27). As plantas de arroz e arroz-vermelho apresentaram maior concentração de Chb que o capim-arroz nessa época de avaliação.

Na terceira época de avaliação (32 horas) observou-se que as plantas reduziram a concentração de Cha e Chtot nos tecidos foliares quando expostas a temperatura de 40°C (Tabela 28). O arroz e arroz-vermelho apresentaram maior atividade da CAT, TBARS, prolina, Cha e Chtot que o capim-arroz (Tabela 29).

Tabela 28 - Média da Concentração de clorofila a (Cha) e clorofila totais (Chtot) em plantas de arroz, arroz-vermelho e capim-arroz submetidas a temperaturas de 25°C e 40°C as 32 horas de tratamento. FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2014.

	25°C	40°C	CV (%)
Cha (mg g ⁻¹ MF)	1,35 * ¹	1,11	16,49
Chtot (mg g ⁻¹ MF)	1,93 *	1,59	24,23

¹ * ou ^{ns} médias diferem ou não entre as temperaturas testadas pelo teste t (p ≤ 0.05).

Tabela 29 - Atividade da enzima catalase (CAT), espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), prolina, clorofila a (Cha) e clorofilas totais (Chtot) em plantas de arroz, arroz-vermelho e capim-arroz as 32 horas de estresse. FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2014.

	Arroz	Arroz-vermelho	Capim-arroz	CV (%)
CAT (UA mg ⁻¹ prot. min ⁻¹)	0,13 a ¹	0,12 a	0,06 b	21,74
TBARS (nM MDA ^{2/} g ⁻¹ de MF)	17,55 a	17,65 a	14,65 b	18,01
Prolina (mg prolina g ⁻¹)	0,06 a	0,06 a	0,04 b	23,45
Cha (mg g ⁻¹ MF)	1,64 a	1,24 a	1,10 b	17,98
Chtot (mg g ⁻¹ MF)	2,25 a	1,87 a	1,45 b	17,41

¹ médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha não diferem pelo teste Duncan (p ≤ 0,05). MF=massa fresca, UA= unidade ativa

Para a coleta realizada às 36 horas de tratamento observou-se interação entre os fatores para as variáveis teor de proteína totais, Cha, Chb, Chtot e CR (Tabela 30); efeito simples do fator espécie para as variáveis atividade da SOD e CAT, teor de H₂O₂, TBARS e prolina (Tabela 31); e, não foi observado efeito dos fatores de tratamentos para a variável atividade da enzima APX.

Quando submetidas a alta temperatura o arroz e arroz-vermelho reduziram a concentração de proteínas nos tecidos; enquanto, o capim-arroz não teve a concentração desse composto alterada pela temperatura do ambiente (Tabela 30). Em ambas temperaturas o arroz e arroz-vermelho tiveram maior concentração de proteínas que o capim-arroz (Tabela 30).

Tabela 30 - Teor de proteínas totais, clorofila a (Cha), clorofila b (Chb), clorofilas totais (Chtot) e carotenoides (CR) em plantas de arroz, arroz-vermelho e capim-arroz submetidas a temperaturas de 25°C e 40°C as 36 horas de tratamento. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2014.

Arroz								Arroz-vermelho		Capim-arroz		CV(%)
Proteína totais (mg caseína g ⁻¹ MF)												
25°C	18,81	* ¹	a ²	16,65	* a	3,11	^{ns} b	21,75				
40°C	12,02		a	9,27	a	3,43	b					
Cha (mg g ⁻¹ MF)												
25°C	1,67	* a	1,08	^{ns} b	0,88	^{ns} b	18,58					
40°C	1,34	a	1,15	ab	1,02	b						
Chb (mg g ⁻¹ MF)												
25°C	0,70	^{ns} a	0,57	* b	0,41	* c	17,98					
40°C	0,57	^{ns} ³	0,39		0,49							
Chtot (mg g ⁻¹ MF)												
25°C	2,37	* a	1,67	^{ns} b	1,29	^{ns} c	16,39					
40°C	1,92	a	1,55	a	1,50	b						
CR (mg g ⁻¹ MF)												
25°C	0,56	* a	0,38	^{ns} b	0,23	^{ns} c	5,83					
40°C	0,44	a	0,38	a	0,24	b						

¹ * ou ns médias diferem ou não entre as temperaturas, dentro de cada variável, pelo teste t (p≤ 0.05).

² médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha não diferem pelo teste de Duncan (p≤0,05).

³ ns= não significativo MF= massa fresca.

Quando submetidas a alta temperatura, plantas de arroz reduziram a concentração de Cha, Chtot e CR; o arroz-vermelho reduziu; e, o capim-arroz aumentou o teor de Chb (Tabela 30). Quando em 25°C o arroz apresentou maior teor de Cha, Chb, Chtot e CR; o capim-arroz apresentou a menor concentração destes compostos; e, o arroz-vermelho não diferiu do arroz quanto a concentração de Cha.

No tratamento a 40°C o arroz apresentou maior concentração de Cha; o capim-arroz a menor; contudo, o arroz-vermelho não diferiu das outras espécies testadas. Para a variável Chb as espécies não diferiram a 40°C, sendo que nessa temperatura o arroz e arroz-vermelho tiveram maior concentração de Chtot e CR que o capim-arroz (Tabela 30).

Plantas de capim-arroz demostraram maior atividade da enzima SOD e menor atividade da CAT que a demais espécies testadas (Tabela 31). Os maiores teores de H₂O₂, TBARS e prolina foram observados em plantas de arroz e os menores em capim-arroz, sendo que o arroz-vermelho não diferiu do capim-arroz no teor de TBARS.

Tabela 31 - Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), teor de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e prolina em plantas de arroz, arroz-vermelho e capim-arroz as 36 horas de tratamento. Capão do Leão/RS, 2014.

	Arroz	Arroz-vermelho	Capim-arroz	CV (%)
SOD (UA mg ⁻¹ prot. min ⁻¹)	3,92 b ¹	2,99 b	6,42 a	29,83
CAT (UA mg ⁻¹ prot. min ⁻¹)	0,30 a	0,14 a	0,07 b	21,07
H ₂ O ₂ (mM g ⁻¹ MF)	11,85 a	9,50 b	4,97 c	17,30
TBARS (nM MDA ^{2/} g ⁻¹ de MF)	19,65 a	15,74 b	13,70 b	15,15
Prolina (mg prolina g ⁻¹)	0,09 a	0,06 b	0,05 c	31,01

¹ médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha, não diferem pelo teste de Duncan (p≤0,05), MF= massa fresca. UA= unidade ativa

Em arroz e arroz-vermelho o tratamento utilizando temperatura supra ótimas resultou no aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), o que foi dimensionado pela concentração de H₂O₂ e pelo aumento das respostas antioxidante dessas plantas. Os resultados observados nas diferentes coletas mostram que as variáveis bioquímicas são instáveis, apresentando variações durante os períodos de avaliação (JONES; SIES, 2015; NOCTOR; MHAMDI; FOYER, 2016). Porém, análise conjunta dos dados demonstra que as plantas de arroz e arroz-vermelho apresentaram efeitos deletérios ocasionados pela temperatura supra ótimas; já, o capim-arroz, em geral, não foi afetado pelas temperaturas.

Verificou-se aumento no teor da espécie reativa de oxigênio H₂O₂ em torno de 36 e 34% para arroz e arroz-vermelho, respectivamente (Tabela 26). Uma das

principais fontes de H_2O_2 em células fotossintetizantes é a fotorrespiração, mais especificamente a reação de oxidação do glicolato, o que também explica a concentração mais alta de H_2O_2 no tecido das plantas C3. Embora as EROs sejam consideradas tóxicas, o H_2O_2 também atua como uma molécula sinalizadora ligada a diversas respostas a estresse (FOYER et al., 2009). O H_2O_2 produzido pela fotorrespiração não apenas inicia a morte celular programada quando seu nível intracelular excede a capacidade das enzimas antioxidantes como a CAT e APX, mas também regula a homeostase redox celular (TAIZ; ZINGER, 2013).

A peroxidação lipídica gera o aldeído malônico (MDA), produto da decomposição de ácidos graxos das biomembranas, sendo que o acúmulo deste é uma forma de atestar a presença de radicais livres e estresse oxidativo (LIU et al., 2009; FAHEED, 2012). Nas plantas de arroz a maior concentração de EROs resultou em aumento na peroxidação de lipídios, sendo observado em plantas do tratamento a 40°C 14% mais TBARS que as plantas do tratamento a 25°C (Tabela 26). Estudos anteriores apontam para o aumento da concentração H_2O_2 e TBARS em plantas de arroz submetidas a temperatura de 40°C (CAO; ZHAO, 2008; KUMAR et al., 2014).

A exposição das plantas C3 a temperaturas subótimas resultaram em maior atividade da SOD, em torno de 77 e 58% em arroz e arroz-vermelho, respectivamente (Tabela 27). A fim, de manter as EROs sob controle, as plantas exibem equilíbrio entre EROs e sistema antioxidante. O aumento da atividade da SOD pode ser uma das possíveis razões para o maior dano de proteínas e pigmentos fotossintéticos nas plantas estressadas, pois ao passo que aumenta a atividade da SOD ocorre também o aumento dos teores de peróxidos de hidrogênio. A SOD é considerada a primeira linha de defesa contra os danos causados pelas EROs, catalisa a conversão do ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) a H_2O_2 e O_2 nos cloroplastos, mitocôndrias, citoplasmas e peroxissomos (WANG et al., 2012) e, desta forma, interfere na concentração das EROs para a produção da radical hidroxila ($\cdot OH$).

Ao contrário do observado nas espécies C3 a atividade da SOD diminuiu em capim-arroz exposto a alta temperatura (Tabela 27); contudo, redução na atividade da SOD em resposta a temperaturas supra ótimas já foi observada no milho, outra espécie com rota fotossintética C4 (MATTERS; SCANDALIOS, 1986). Por outro lado, trabalhos mostram que a exposição de plantas C3, como tomate (RIVERO et al. 2004), trigo (DASH; MOHANTY, 2002) e arroz (KUMAR et al., 2014) a temperaturas

supra ótimas estimulou a atividade da SOD, dados que corroboram com os encontrados no presente estudo.

As enzimas do sistema antioxidante não eliminam o $^*\text{OH}$ diretamente, de modo que a regulação de seus precursores, O_2^{*-} e H_2O_2 , é o passo fundamental na prevenção dos riscos do $^*\text{OH}$, reunindo a ação das enzimas SOD, APX e CAT (BHATTACHARJEE, 2010). Dessa forma, a combinação eficiente da SOD, CAT e APX minimiza os efeitos do estresse oxidativo, apresentando papel importante na regulação de EROs (DAMANIK et al., 2012).

Observou-se que a temperatura subótimas em arroz e arroz-vermelho, resultou em aumento na atividade da CAT em arroz; e na atividade da APX em arroz e arroz-vermelho. A CAT e a APX atuam na remoção do H_2O_2 resultante da atividade da SOD, convertendo-o a água. No entanto, há afinidade diferenciada dessas duas enzimas pelo seu substrato, de modo que a APX, com sua afinidade alta atua quando o H_2O_2 está presente em baixas concentrações e a CAT, por outro lado, tem comportamento inverso (GILL; TUTEJA, 2010), o que pode explicar a diferença da atividade dessas enzimas nas diferentes épocas de avaliações. Temperaturas de 40°C também estimularam a atividade da CAT e APX em plantas de arroz, milho e trigo; porém, temperaturas de 45°C reduziram a atividade das enzimas nessas plantas (BALLA et al., 2009; KUMAR et al., 2014).

As espécies testadas não apresentaram variações na concentração de prolina quando submetidas a alta temperatura, ao contrário do reportado em diferentes espécies em condição de estresse térmico (MUTHA et al., 2007; KUMAR et al., 2014, TALWAR et al., 2002). O acúmulo de prolina em células vegetais tem sido sugerido como mecanismo de ajuste osmótico durante o estresse hídrico (FAHRAMAND et al., 2014), entretanto alguns autores sugerem que a prolina atua como estabilizador de estrutura celulares (SCHOBERT; TSCHESCHE, 1978), degradação de radicais livres (HAYAT, et al., 2012), componente da cascata de sinalização de estresse (WERNER; FINKELSTEIN, 1995) e constituinte de proteína da parede celular de plantas (LUM et al., 2014), estando desta forma ligada com a resposta a diversos estresses abióticos.

A redução de proteínas totais foi outra consequência da exposição de plantas C3 a temperaturas de 40°C , em arroz-vermelho a redução em proteínas foi mais acentuada que em arroz, chegando a mais de 43%; já, em arroz a redução foi de 36%. As proteínas são encontradas em todas as partes das células, uma vez que são fundamentais sob todos os aspectos da estrutura e função celulares, e alterações nos

teores de proteínas podem representar em grande dano para o crescimento e desenvolvimento das plantas.

Temperatura elevada geralmente causa danos celulares e oxidação de lipídios de membranas, o que além aumentar a permeabilidade destas, causa degradação de muitas organelas importantes como os cloroplastos, resultando em comprometimento do aparato fotossintético, e afetando diversas atividades metabólicas das plantas podendo refletir em redução crescimento e produtividade dessas (GILL; TUTEJA, 2010). Verificou-se efeitos deletérios da temperatura de 40°C sobre o conteúdo de pigmentos nas plantas C3, onde em arroz os teores de Cha, Chtot e CR reduziram em torno de 20%, mesma porcentagem de redução observada em Chb nas plantas de arroz-vermelho (Tabelas 11 e 12). A redução na concentração de pigmentos fotossintéticos leva a redução da fotossíntese (WAHID et al., 2007), degradação de clorofilas durante estresse por altas temperaturas já foi relatado em outras espécies (GUO et al., 2007; REDA; MANDOURA, 2011). Em arroz, genótipos tolerantes a altas temperaturas mantiveram o teor de clorofilas por mais tempo que genótipos suscetíveis (SOHN; BACK, 2007).

A fotossíntese líquida observada nas plantas C3 na temperatura de 40°C, além de ser afetada negativamente pelo fechamento estomático e aumento da fotorrespiração, teve redução decorre da degradação dos pigmentos fotossintetizantes, pois as clorofilas estão localizadas principalmente nas membranas dos tilacoides, onde formam complexo com proteínas do fotossistema I (PSI) e fotossistema II (PSII) (VACHA et al., 2007), danos nos tilacoides levam a perdas de clorofilas, sendo as membranas dos tilacoides mais sensíveis a altas temperaturas que as demais estruturas dos cloroplastos (SAYED; EARNSHAW; EMES, 1989). Contudo, a redução do teor de clorofilas não é somente resultado da degradação dessas, mas também resulta da redução de biossíntese desses pigmentos em plantas expostas a estresse térmico, pois o aumento da temperatura causa a desnaturação de muitas enzimas envolvidas na síntese de clorofilas (REDA; MANDOURA, 2011).

Os carotenoides, por sua vez, protegem as plantas de muitos tipos de estresses, pois atuam como estabilizadores e protetores de lipídios nas membranas dos tilacoides (CAMEJO et al., 2006). O papel dos CR na eliminação de EROs já foi amplamente relatado (DAVISON et al., 2002; VERMA; MISHRA, 2005), sendo verificado que plantas mais tolerantes a altas temperaturas e alta incidência de luz

apresentavam maiores concentrações de certos CR em seus tecidos foliares (DAVISON et al., 2002; YILDIZ; TERZI, 2008).

Em condição estresse térmico não se verificou diferença entre a capacidade fotossintéticas e os danos oxidativos das plantas C3 testadas. Apesar de haver relatos que o arroz-vermelho apresenta maior eficiência da utilização de CO₂ e nitrogênio, componentes importantes relacionados à fotossíntese, em comparação ao arroz cultivado (ZISKA; McCLUNG, 2008; CHAUHAN; JOHNSON, 2011). Contudo, o arroz apresentou maior degradação de pigmentos fotossintéticos que o arroz-vermelho, o que seria um indicativo de maior suscetibilidade da cultura a alta temperatura; mas, observou-se que o arroz-vermelho teve maior degradação de proteínas que o arroz, não sendo possível afirmar qual das duas espécies apresentou maiores danos quando submetida a temperaturas subaótimas.

As plantas de capim-arroz não foram afetadas negativamente pela temperatura de 40°C. Plantas C4 normalmente tem eficiência fotossintética maior em relação a plantas C3, principalmente em ambientes áridos, quentes e sob alta concentração de luz, isso ocorre devido ao mecanismo adicional de fixação de carbono e de característica foliares que essas plantas possuem e que limitam a fotorrespiração, processo que reduz também a geração de espécies reativas de oxigênio (ASHRAF, HARRIS, 2013).

Analisando-se as correlações de Pearson, para cada época de avaliação, às 24 horas após os tratamentos, que das 136 possíveis correlações 55% foram significativas, sendo dessas 68% positivas e 32% negativas (Tabela 31). Verificou-se nessa correlação positiva entre teor de H₂O₂ e atividade das enzimas SOD e APX e concentração negativa entre H₂O₂ e CR, demonstrando que o aumento da concentração de H₂O₂ induziu a maior atividade das enzimas antioxidantes e reduziu o conteúdo de alguns pigmentos.

Para a avaliação realizada as 28 horas, observou-se que 65% das possíveis correlações foram significativas, sendo dessas 63% positivas e 37% negativas (Tabela 33). Foi observada correlação positiva entre EC e conteúdo de proteína ou CR; por outro lado, para a mesma variável obteve-se correlação negativa com atividade da SOD, CAT, APX, teor de H₂O₂ e TBARS. A partir dessas correlações pode-se inferir que o aumento da concentração de H₂O₂ e TBARS e da atividade antioxidante das

plantas causa redução na EC, sendo que essa redução influencia negativamente a concentração de proteínas e carotenoides.

Na avaliação realizada às 32 horas, 65% das possíveis correlações foram significativas, sendo 60% correlações positivas e 40% negativas (Tabela 34). Nessa época de avaliação foi possível verificar que A teve correlação positiva com teor de proteína e negativa com a atividade da SOD, teor de H_2O_2 e TBARS, indicando que o aumento do estresse oxidativo leva a redução de assimilação de carbono nas espécies, de modo similar as inferências das avaliações anteriores.

Na última avaliação, realizada as 36 horas após o início dos tratamentos, apenas 47% das correlações foram significativas, sendo dessas 54% positivas e 46% negativas. Entre as correlações significativas destacam-se a correlação positiva entre A e teor de proteína e CR e negativa de A e teor de H_2O_2 (Figura 35).

A partir dos resultados das correlações observou-se que as épocas com maiores respostas fisiológicas e bioquímicas das plantas a alta temperatura foram as 28 e 32 horas, isso se explica pelo horário que as avaliações foram realizadas, as 11:00 e 15:00 horas, respectivamente. Uma vez que as outras duas coletas foram realizadas no começo da manhã e final da tarde, horários que naturalmente a atividade fotossintética das plantas é mais baixa (TAIZ; ZEIGER, 2013). De forma geral, pode-se observar que as plantas testadas tiveram impactos negativos sobre as variáveis fotossintéticas avaliadas, a redução na fotossíntese líquida em plantas C3, foi ocasionada em parte pela redução da condutância estomática, mas também devido a danos celulares ocasionados pelas EROs, que causaram redução de proteínas e pigmentos fotossintetizantes.

Tabela 32 - Correlação de Pearson entre as variáveis taxa fotossintética (A), condutância estomática (gs), concentração subestomática de CO₂ (Ci), transpiração (E), eficiência de carboxilação (CE), eficiência do uso da água (EUA), teor de proteínas (Prot), atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX), peróxido de hidrogênio (H₂O₂), espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), prolina (Prol), clorofila a (Cha), clorofila b (Chb), clorofilas totais (Chtot) e carotenoides na média em plantas de arroz, arroz-vermelho e capim-arroz as 24 horas de estresse. FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2014.

	A	gs	Ci	E	EC	EUA	Prot	SOD	CAT	APX	H ₂ O ₂	TBARS	Prol	Cha	Chb	Chtot	CR
A	1,00																
gs	0,83 ^{*1}	1,00															
Ci	0,99*	0,84*	1,00														
E	-0,56*	-0,87*	-0,58*	1,00													
EC	-0,80*	-0,82*	-0,83*	-0,67*	1,00												
EUA	0,61*	0,76*	-0,60*	0,59*	-0,67*	1,00											
Prot	-0,17 ^{ns}	0,03 ^{ns}	-0,12 ^{ns}	0,17 ^{ns}	0,01 ^{ns}	-0,29 ^{ns}	1,00										
SOD	0,55*	0,49*	0,53*	-0,06 ^{ns}	-0,48*	0,59*	-0,21 ^{ns}	1,00									
CAT	0,27 ^{ns}	0,41*	0,29 ^{ns}	-0,18 ^{ns}	-0,52*	0,32 ^{ns}	0,16 ^{ns}	0,29 ^{ns}	1,00								
APX	0,50*	0,31 ^{ns}	0,48*	-0,27 ^{ns}	-0,42*	0,56*	-0,24 ^{ns}	0,17 ^{ns}	0,29 ^{ns}	1,00							
H ₂ O ₂	0,53*	0,56*	0,55*	-0,26 ^{ns}	-0,59*	0,83*	0,40 ^{ns}	0,48*	0,15 ^{ns}	0,52*	1,00						
TBARS	0,13 ^{ns}	-0,01 ^{ns}	0,08 ^{ns}	-0,16 ^{ns}	0,03 ^{ns}	0,10 ^{ns}	0,22 ^{ns}	0,03 ^{ns}	-0,10 ^{ns}	0,39 ^{ns}	-0,33 ^{ns}	1,00					
Prol	0,69*	0,73*	0,66*	-0,58*	-0,66*	0,63*	-0,23 ^{ns}	0,42 ^{ns}	0,35 ^{ns}	0,48*	0,41 ^{ns}	0,22 ^{ns}	1,00				
Cha	0,49*	0,34 ^{ns}	0,46*	-0,18 ^{ns}	-0,45*	0,52*	-0,24 ^{ns}	0,33 ^{ns}	0,21 ^{ns}	0,92*	0,52*	0,17 ^{ns}	0,58*	1,00			
Chb	0,49*	0,38 ^{ns}	0,47*	-0,30 ^{ns}	-0,48*	0,61*	-0,24 ^{ns}	0,36 ^{ns}	0,27 ^{ns}	0,99*	0,53*	0,14 ^{ns}	0,68*	0,97*	1,00		
Cht	0,81*	0,74*	0,79*	-0,60*	-0,67*	0,80*	-0,15 ^{ns}	0,40 ^{ns}	0,32 ^{ns}	0,75*	0,76*	0,01 ^{ns}	,76*	0,68*	0,78*	1,00	
CR	0,69*	-0,89*	-0,68*	0,60*	0,84*	-0,74*	-0,07 ^{ns}	-0,56*	-0,37 ^{ns}	-0,39 ^{ns}	-0,55*	-0,06 ^{ns}	-0,59*	-0,31 ^{ns}	-0,45 ^{ns}	-0,66*	1,00

¹ * significante e ^{ns} não significante p≤0,05

Tabela 33 - Correlação de Pearson entre as variáveis taxa fotossintética (A), condutância estomática (gs), concentração subestomática de CO₂ (Ci), transpiração (E), eficiência de carboxilação (EC), eficiência do uso da água (EUA), teor de proteínas (Prot), atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX), peróxido de hidrogênio (H₂O₂), espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), prolina (Prol), clorofila a (Cha), clorofila b (Chb), clorofilas totais (Chtot) e carotenoides na média em plantas de arroz, arroz-vermelho e capim-arroz as 28 horas de estresse. FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2014.

	A	gs	Ci	E	EC	EUA	Prot	SOD	CAT	APX	H ₂ O ₂	TBARS	Prol	Cha	Chb	Chtot	CR
A	1.00																
Gs	0,23 ^{ns1}	1.00															
Ci	0,68*	0,49*	1.00														
E	-0,03 ^{ns}	-0,94*	-0,34 ^{ns}	1.00													
CE	-0,28 ^{ns}	-0,99*	-0,54*	0,94*	1.00												
WUE	-0,38 ^{ns}	0,80*	-0,09 ^{ns}	-0,91*	-0,79*	1.00											
Prot	0,03 ^{ns}	-0,53*	-0,03 ^{ns}	0,62*	0,56*	-0,56*	1.00										
SOD	0,05 ^{ns}	0,65*	0,25 ^{ns}	-0,65*	-0,66*	0,80*	-0,25 ^{ns}	1.00									
CAT	-0,35 ^{ns}	0,61*	0,22 ^{ns}	-0,55*	-0,57*	0,72*	-0,05 ^{ns}	0,81*	1.00								
APX	0,44 ^{ns}	0,61*	0,55*	-0,52*	-0,62*	0,64*	-0,47*	0,61*	0,48 ^{ns}	1.00							
H ₂ O ₂	0,47 ^{ns}	0,03 ^{ns}	0,51*	0,02 ^{ns}	-0,72*	-0,01 ^{ns}	0,01 ^{ns}	0,11 ^{ns}	0,16 ^{ns}	0,40 ^{ns}	1.00						
TBARS	-0,06 ^{ns}	0,71*	0,63*	-0,70*	-0,87*	0,69*	-0,28 ^{ns}	0,74*	0,68*	0,63*	0,22 ^{ns}	1.00					
Prol	0,23 ^{ns}	0,85*	0,54*	-0,81*	-0,87*	0,72*	-0,62*	0,66*	0,60*	0,73*	0,34 ^{ns}	0,84*	1.00				
Cha	0,16 ^{ns}	0,49*	-0,48*	-0,48*	-0,55*	0,57*	-0,48*	0,56*	0,38 ^{ns}	0,93*	0,45 ^{ns}	0,54*	0,69*	1.00			
Chb	0,46 ^{ns}	0,52*	-0,35 ^{ns}	-0,35 ^{ns}	-0,53*	0,37 ^{ns}	-0,42 ^{ns}	0,53*	0,43 ^{ns}	0,97*	0,54*	0,59*	0,72*	0,88*	1.00		
Cht	0,27 ^{ns}	0,87*	-0,84*	-0,84*	-0,87*	0,78*	-0,57*	0,77*	0,63*	0,83*	0,33 ^{ns}	0,78*	0,90*	0,78*	0,73*	1.00	
CR	0,01 ^{ns}	-0,74*	0,80*	0,80*	0,72*	-0,81*	0,58*	-0,49*	-0,37 ^{ns}	0,44 ^{ns}	0,13 ^{ns}	-0,53*	-0,66*	-0,38 ^{ns}	-0,22 ^{ns}	-0,62*	1.00

¹ * significante e ^{ns} não significante p≤0,05.

Tabela 34 - Correlação de Pearson entre as variáveis taxa fotossintética (A), condutância estomática (gs), concentração subestomática de CO₂ (Ci), transpiração (E), eficiência de carboxilação (EC), eficiência do uso da água (EUA), teor de proteínas (Prot), atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX), peróxido de hidrogênio (H₂O₂), espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), prolina (Prol), clorofila a (Cha), clorofila b (Chb), clorofilas totais (Chtot) e carotenoides na média em plantas de arroz, arroz-vermelho e capim-arroz as 28 horas de estresse. FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2014.

	A	gs	Ci	E	EC	EUA	Prot	SOD	CAT	APX	H ₂ O ₂	TBARS	Prol	Cha	Chb	Chtot	CR
A	1,00																
gs	-0,43 ^{*1}	1,00															
Ci	-0,38*	0,61*	1,00														
E	-0,52*	0,48*	0,69*	1,00													
CE	0,75*	-0,23 ^{ns}	0,50*	-0,56*	1,00												
WUE	0,78*	-0,50*	-0,68*	-0,73*	0,82*	1,00											
Prot	0,75*	0,32 ^{ns}	0,56*	0,56*	-0,55*	-0,64*	1,00										
SOD	-0,59*	-0,63*	-0,24 ^{ns}	-0,43*	0,31 ^{ns}	0,32 ^{ns}	-0,45*	1,00									
CAT	-0,55*	0,48*	0,33 ^{ns}	0,31 ^{ns}	-0,51*	0,43*	0,46*	-0,59*	1,00								
APX	0,18 ^{ns}	0,16 ^{ns}	-0,06 ^{ns}	-0,19 ^{ns}	-0,08 ^{ns}	0,27 ^{ns}	-0,29 ^{ns}	-0,42*	0,27 ^{ns}	1,00							
H ₂ O ₂	-0,84*	0,57*	-0,68*	0,65*	-0,74*	-0,83*	0,77*	-0,47*	0,48*	-0,09 ^{ns}	1,00						
TBARS	-0,49*	0,16 ^{ns}	0,42*	0,47*	-0,35 ^{ns}	-0,46*	0,66*	-0,22 ^{ns}	0,14 ^{ns}	-0,06 ^{ns}	0,65*	1,00					
Prol	-0,49*	0,22 ^{ns}	0,19 ^{ns}	0,35 ^{ns}	-0,31 ^{ns}	-0,37 ^{ns}	0,36 ^{ns}	-0,35 ^{ns}	0,25 ^{ns}	-0,08 ^{ns}	0,52*	0,42*	1,00				
Cha	-0,47*	0,46*	0,54*	0,44*	-0,37*	-0,45*	0,56*	-0,36 ^{ns}	0,43*	-0,15 ^{ns}	0,49*	0,29 ^{ns}	0,58*	1,00			
Chb	-0,42*	0,44*	0,45*	0,31 ^{ns}	-0,23 ^{ns}	-0,33 ^{ns}	0,45*	-0,29 ^{ns}	0,36 ^{ns}	-0,13 ^{ns}	0,39 ^{ns}	0,25 ^{ns}	0,52*	0,95*	1,00		
Cht	-0,46*	0,44*	0,53*	0,38*	-0,32 ^{ns}	0,39 ^{ns}	0,60*	-0,32 ^{ns}	0,37 ^{ns}	-0,12 ^{ns}	0,49*	0,39 ^{ns}	0,57*	0,99*	0,97*	1,00	
CR	-0,68*	0,56*	0,71*	0,62*	-0,63*	-0,70*	0,84*	-0,51*	0,61*	-0,03 ^{ns}	0,77*	0,49*	0,61*	0,88*	0,76*	0,86*	1,00

¹ * significante e ^{ns} não significante p≤0,05.

Tabela 35 - Correlação de Pearson entre as variáveis taxa fotossintética (A), condutância estomática (gs), concentração subestomática de CO₂ (Ci), transpiração (E), eficiência de carboxilação (EC), eficiência do uso da água (EUA), teor de proteínas (Prot), atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX), peróxido de hidrogênio (H₂O₂), espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), prolina (Prol), clorofila a (Cha), clorofila b (Chb), clorofilas totais (Chtot) e carotenoides na média em plantas de arroz, arroz-vermelho e capim-arroz as 32 horas de estresse. FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2014.

	A	gs	Ci	E	EC	EUA	Prot	SOD	CAT	APX	H ₂ O ₂	TBARS	Prol	Cha	Chb	Chtot	CR
A	1,00																
gs	-0,46 ^{*1}	1,00															
Ci	-0,40*	0,73*	1,00														
E	-0,37*	0,99*	0,79*	1,00													
CE	0,70*	-0,03 ^{ns}	-0,02 ^{ns}	-0,01 ^{ns}	1,00												
WUE	0,82*	0,82*	-0,58*	-0,70*	0,36*	1,00											
Prot	0,80*	0,61*	0,62*	0,64*	0,45*	-0,84*	1,00										
SOD	0,32 ^{ns}	-0,52*	-0,55*	-0,47*	0,15 ^{ns}	0,37*	-0,35*	1,00									
CAT	-0,28 ^{ns}	-0,04 ^{ns}	-0,04 ^{ns}	-0,01 ^{ns}	-0,40*	-0,10 ^{ns}	0,04 ^{ns}	-0,35*	1,00								
APX	-0,20 ^{ns}	-0,14 ^{ns}	-0,10 ^{ns}	-0,14 ^{ns}	-0,62*	-0,17 ^{ns}	0,0 ^{ns}	0,23 ^{ns}	0,83*	1,00							
H ₂ O ₂	-0,70*	-0,39*	0,37*	0,32 ^{ns}	-0,09 ^{ns}	-0,70*	0,60*	0,36*	-0,10 ^{ns}	0,49*	1,00						
TBARS	-0,25 ^{ns}	0,37*	0,30 ^{ns}	0,28 ^{ns}	-0,24 ^{ns}	-0,41*	0,24 ^{ns}	0,04 ^{ns}	-0,56*	-0,28 ^{ns}	0,17 ^{ns}	1,00					
Prol	-0,10 ^{ns}	-0,17 ^{ns}	-0,10 ^{ns}	-0,19 ^{ns}	-0,24 ^{ns}	0,03 ^{ns}	-0,16 ^{ns}	0,24 ^{ns}	0,95*	0,71*	0,32 ^{ns}	-0,65*	1,00				
Cha	-0,41*	0,65*	0,51*	0,46*	-0,07 ^{ns}	-0,57*	0,52*	0,01 ^{ns}	-0,26 ^{ns}	-0,26 ^{ns}	0,26 ^{ns}	0,49*	-0,36*	1,00			
Chb	-0,37*	0,08 ^{ns}	0,03 ^{ns}	0,13 ^{ns}	-0,28 ^{ns}	-0,34 ^{ns}	0,17 ^{ns}	-0,27 ^{ns}	0,93*	0,74*	0,55*	-0,48*	0,90*	-0,18 ^{ns}	1,00		
Cht	-0,47*	0,73*	0,57*	0,40*	-0,01 ^{ns}	-0,71*	0,69*	0,03 ^{ns}	-0,29 ^{ns}	-0,14 ^{ns}	0,33 ^{ns}	-0,48*	-0,41 ^{ns}	0,95*	-0,09 ^{ns}	1,00	
CR	0,82*	-0,06 ^{ns}	-0,08 ^{ns}	0,24 ^{ns}	-0,76*	0,24 ^{ns}	-0,08 ^{ns}	-0,12 ^{ns}	-0,10 ^{ns}	0,43*	-0,13 ^{ns}	-0,53*	-0,03 ^{ns}	-0,14 ^{ns}	-0,23 ^{ns}	-0,17 ^{ns}	1,00

¹ * significante e ^{ns} não significante p≤0,05.

A primeira etapa das análises moleculares foi a escolha dos genes de referências, sendo a eficiência de amplificação dos primers de referência calculada individualmente a partir do logaritmo (Log) das diluições de cDNA. A diluição mais adequada para amplificação das amostras foi de 1:25, posteriormente também utilizada para a expressão dos genes alvo. As eficiências variaram entre 2,04 e 2,48 para arroz; 2,14 e 2,36 para arroz-vermelho; e, 1,74 e 2,29 para capim-arroz. Para as três espécies testadas, os genes endógenos RNA ribossômico 18S (*Os18S*), fator de iniciação de eucarioto 4- α (*OsElf-4a*), β -Tubulina (*Os β -Tub*) e ubiquitina-conjugada enzima E2 (*OsUBC-E2*), tiveram sua eficiência dentro do esperado (entre 1,8 e 2,2), portanto foram utilizados para o teste da estabilidade e, posteriormente, os mais estáveis foram utilizados para a análise de expressão dos genes alvo (Tabela 17). Os genes da actina (*OsACT*), ubiquitina 10 (*OsUBQ10*) e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*OsGAPDH*) apresentaram eficiência fora do esperado e foram descartados das análises posteriores.

Utilizou-se o valor do ciclo de quantificação (Cq) para determinar o nível de expressão dos genes candidatos a endógenos estudados, sendo verificado que o gene *OsElf-4a* foi o menos expresso, pois apresentou o maior valor de Cq (33,32), por outro lado o gene *Os18S* foi o mais expresso, tendo o maior valor de Cq (18,55) (Figura 8 e Tabela 36). Outros estudos reportam o alto nível de expressão do gene 18S (GALLI, et al., 2015; JAIN et al., 2006; MAROUFI; BOCKSTAELE; LOOSE, 2010), o que não é desejado, pois para o uso desse gene seria necessárias diluições maiores do que as utilizadas nesse estudo, o que pode reduzir a precisão da análise. Os quatro genes avaliados apresentaram baixa variação na expressão, como pode ser observado pelo tamanho dos caixas e dos limites superiores e inferiores dos gráficos, sendo *OsUBC-E2* o mais estável (Figura 8).

A estabilidade da expressão dos genes pode ser observada pelo desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (Tabela 36), os menores DP foram observados para *Os β -Tub* e *OsUBC-E2* (0,75 e 0,95, respectivamente), assim como o menor CV (2,50 e 2,33, respectivamente), demonstrando assim serem entre os quatro genes analisados os mais estáveis na expressão.

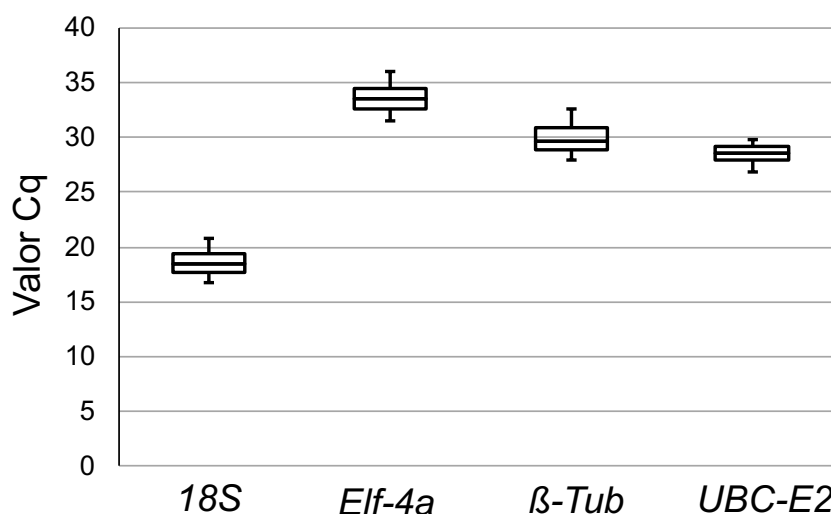


Figura 5 - Nível de expressão dos genes endógenos RNA ribossômico 18S (*18S*), fator de iniciação de eucarioto 4- α (*Elf-4a*), β -Tubulina (*β -Tub*) e ubiquitina-conjugada enzima E2 (*UBC-E2*). Dados da expressão referentes aos valores dos ciclos de quantificação (Cq) em RT-qPCR para cada um dos quatro genes em arroz, arroz-vermelho e capim-arroz submetidos aos tratamentos nas temperaturas. A parte inferior e superior das caixas representam os quartis 25 e 75%, respectivamente, as extremidades das linhas representam o valor máximo e mínimo de expressão de cada primer. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2014.

Tabela 36 - Média geral ($\bar{X}$), desvio padrão (σ) e coeficiente de variação (CV) dos genes endógenos RNA ribossômico 18S (*Os18S*), fator de iniciação de eucarioto 4- α (*OsElf-4a*), β -Tubulina (*Os β -Tub*) e ubiquitina-conjugada enzima E2 (*OsUBC-E2*) candidatos a genes referência para arroz, arroz-vermelho e capim-arroz. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2014.

	Genes candidatos a referência			
	<i>Os18S</i>	<i>OsElf-4a</i>	<i>Osβ-Tub</i>	<i>OsUBC-E2</i>
$\bar{X}$	18,55	33,32	30,01	28,49
σ	1,30	1,41	0,75	0,95
CV	7,03	4,25	2,50	2,33

Para avaliar a estabilidade de expressão dos genes de referência, além da análise de variância, também foi utilizada a estabilidade média de expressão utilizando os programas comparativo Δ -Ct, BestKeeper, NormFinder e geNorm, através de ferramenta web que fornece ranking de estabilidade conhecida com RefFinder. Pode-se observar pequenas diferenças entre as classificações dos programas utilizados, isso acontece devido cada programa se basear em diferente algoritmo para calcular a estabilidade de expressão dos genes (ANDERSEN; JENSEN; ORNTTOFT, 2004).

De acordo com o método comparativo de Δ -Ct, os genes *Tubulina* e *OsUBC-E2* foram os mais estáveis, apresentando a média do desvio padrão de 1,71 e 1,76 (Figura 9A). De acordo com o BestKeeper apenas o gene *OsUBC-E2* poderia ser utilizado como gene referência, pois foi o único que apresentou o DP menor que 1

(Figura 9B). Por outro lado, todos os genes que apresentam o valor V de estabilidade menor que 1,5, são considerados estáveis pelo programa NormFinder, sendo desta forma aptos para serem referência nas condições experimentais (Figura 2C).

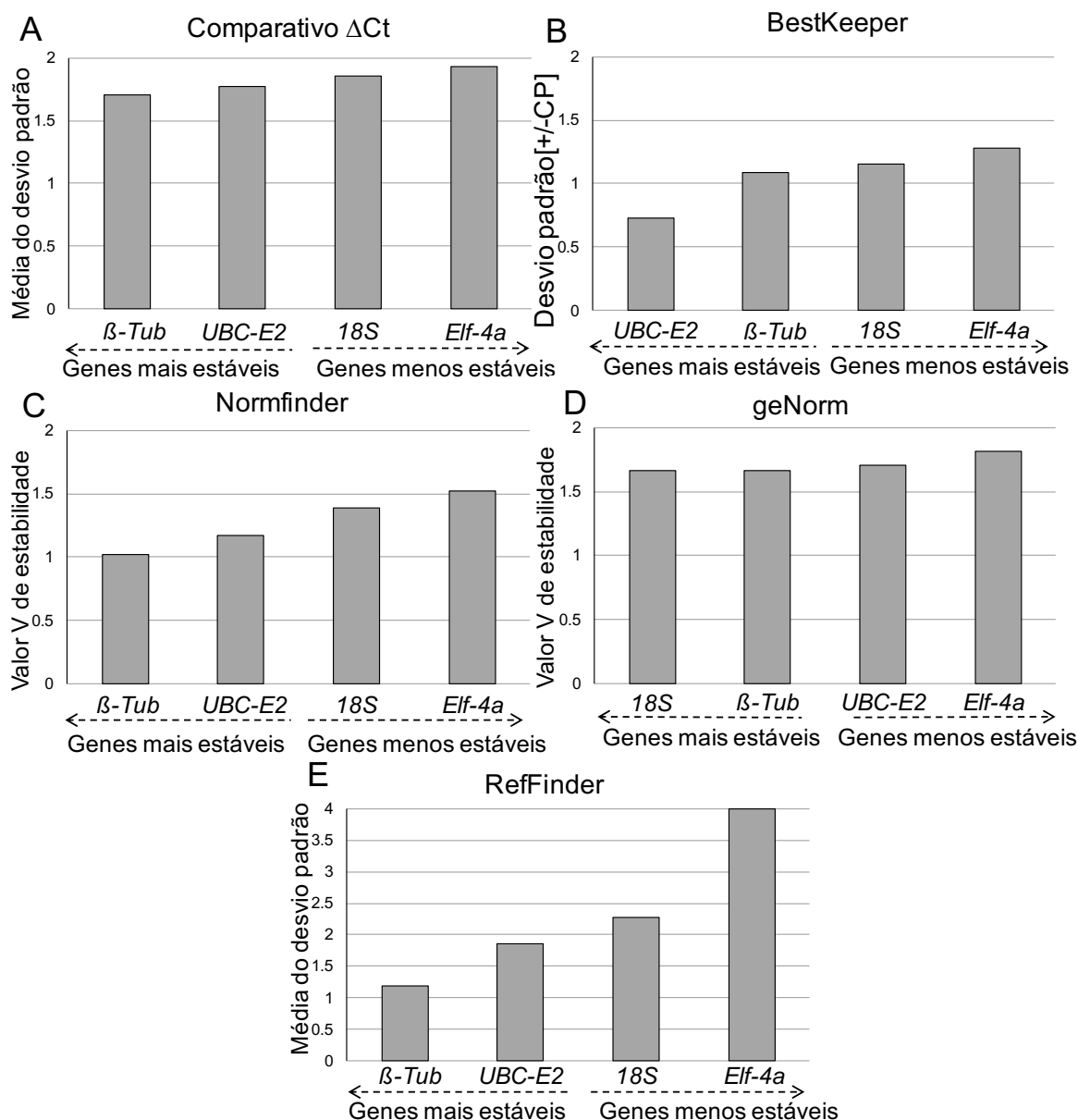


Figura 6 - Estabilidade de expressão dos genes endógenos RNA ribossômico 18S (18S), fator de iniciação de eucarioto 4- α (Elf-4a), β -Tubulina (β -Tub) e ubiquitina-conjugada enzima E2 (UBC-E2) em arroz, arroz-vermelho e capim-arroz expostos as temperaturas de 25 e 40°C, calculados pelos algoritmos comparativos delta-Ct (A), BestKeeper (B), NormFinder (C), geNorm (D) e RefFinder (E). FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2014.

De acordo com o programa geNorm, o gene mais estável foi o *Os18S*, seguido pela *Os β -Tub* (Figura 9D); contudo, podemos observar que o valor V de estabilidade não apresentou grandes variações para os genes nesse programa, sendo de 1,66

para o *18S*, gene mais estável e de 1,82 para o *OsElf-4a*, gene menos estável. Por fim, o programa RefFinder integra os resultados encontrados nos quatro outros programas e gera a classificação final, indicando de forma geral quais os genes candidatos tem a expressão mais estável em determinadas condições experimentais. Segundo essa classificação os quatro genes testados são recomendados para uso como endógeno em experimento de arroz, arroz-vermelho e capim-arroz submetidos a diferentes temperaturas na seguinte ordem *Os β -Tub* > *OsUBC-E2* > *Os18S* > *OsElf-4a*.

O gene *Tubulina* é gene referência comum em diversos trabalhos de RT-qPCR (GRIGOROVA et al., 2011; STÜRZENBAUM; KILLE, 2001); contudo, outros trabalhos apontam o gene *Tubulina* com instável em determinada condição experimental (AMIL-RIZ et al., 2013; MAROUFI; VAN BOCKSTAELE; LOOSE, 2010), o que reforça a necessidade do estudo de normalização dos genes para a escolha do endógeno apropriado.

Estudos de expressão genica anteriores apontam que o uso de apenas um gene normalizador pode gerar resultados imprecisos em RT-qPCR (AMIL-RIZ et al., 2013; GALLI et al., 2015), sendo adequado o uso de dois ou mais genes referência, embora no presente estudo os genes candidatos tenham apresentado grande estabilidade de expressão.

O programa geNorm possui ferramenta que indica o número mínimo de genes referência a serem usados de forma a manter a acurácia dos resultados. O programa utiliza o cálculo da variação de pares V_n/V_{n+1} entre dois fatores de normalização sequenciais para determinar a necessidade de adicionar o próximo gene referência e assim gerar resultados mais consistentes. De acordo com esse critério, valores de variação de pares (V) menores que o ponto de corte 0,15; indicam o número de genes necessários. No presente trabalho observamos que V_2/V_3 foi de 0,025, indicando que dois genes normalizadores são o suficiente nessas condições experimentais (Figura 10).

Os genes endógenos ideais devem apresentar expressão relativamente estável em amostras biológicas distintas, que podem ser de diferentes tipos de células, estádios de desenvolvimento, amostras expostas a diferentes condições experimentais, ou mesmo em diferentes espécies (YAN et al., 2014). Análise conjunta de todos os dados de normalização dos genes referência mostram que o uso dos genes *Os β -Tub* e *OsUBC-E2* como controle interno foram suficientes para a

normalização do estudo de expressão genica em arroz, arroz-vermelho e capim-arroz expostos a temperaturas de 25 e 40°C.

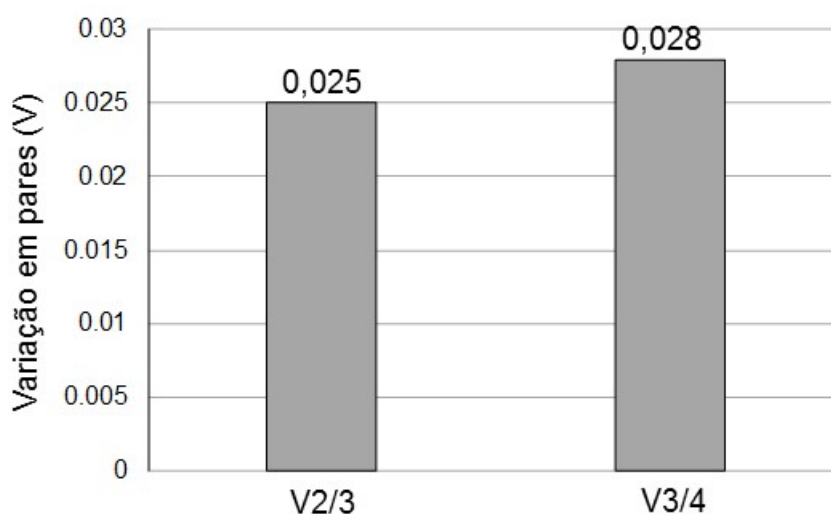


Figura 7 - Variação em pares (V) calculada pelo programa geNorm para determinar o número mínimo de genes referência necessários para a normalização de amostras de arroz, arroz-vermelho e capim-arroz expostos as temperaturas de 25 e 40°C. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2015.

Após escolhido os genes endógenos realizou-se o cálculo da expressão dos genes alvos *OsAPX2*, *OsHSP24.15* e *OsHSP71.10*. Observou-se interação entre os fatores de tratamento espécie e temperatura para a expressão três genes analisados em ambas nas épocas de avaliação (28 e 32 horas) (Figura 11).

Às 28 horas após os tratamentos o arroz e arroz-vermelho aumentaram a expressão do gene *OsAPX2* quando expostos a temperatura de 40°C, sendo o aumento na expressão em torno de 2,8 e 1,8 vezes, respectivamente. O capim-arroz não teve a expressão desse gene afetada pela diferença da temperatura nessa época de avaliação (Figura 11A). Verificou-se que em ambas as temperaturas arroz-vermelho acumulou maior número de transcritos do gene *OsAPX2* que o arroz e capim-arroz, verificando-se que o arroz-vermelho expressou cerca de 16 e 10 vezes

mais o gene que o arroz, nas temperaturas de 25 e 40°C, respectivamente (Figura 11A).

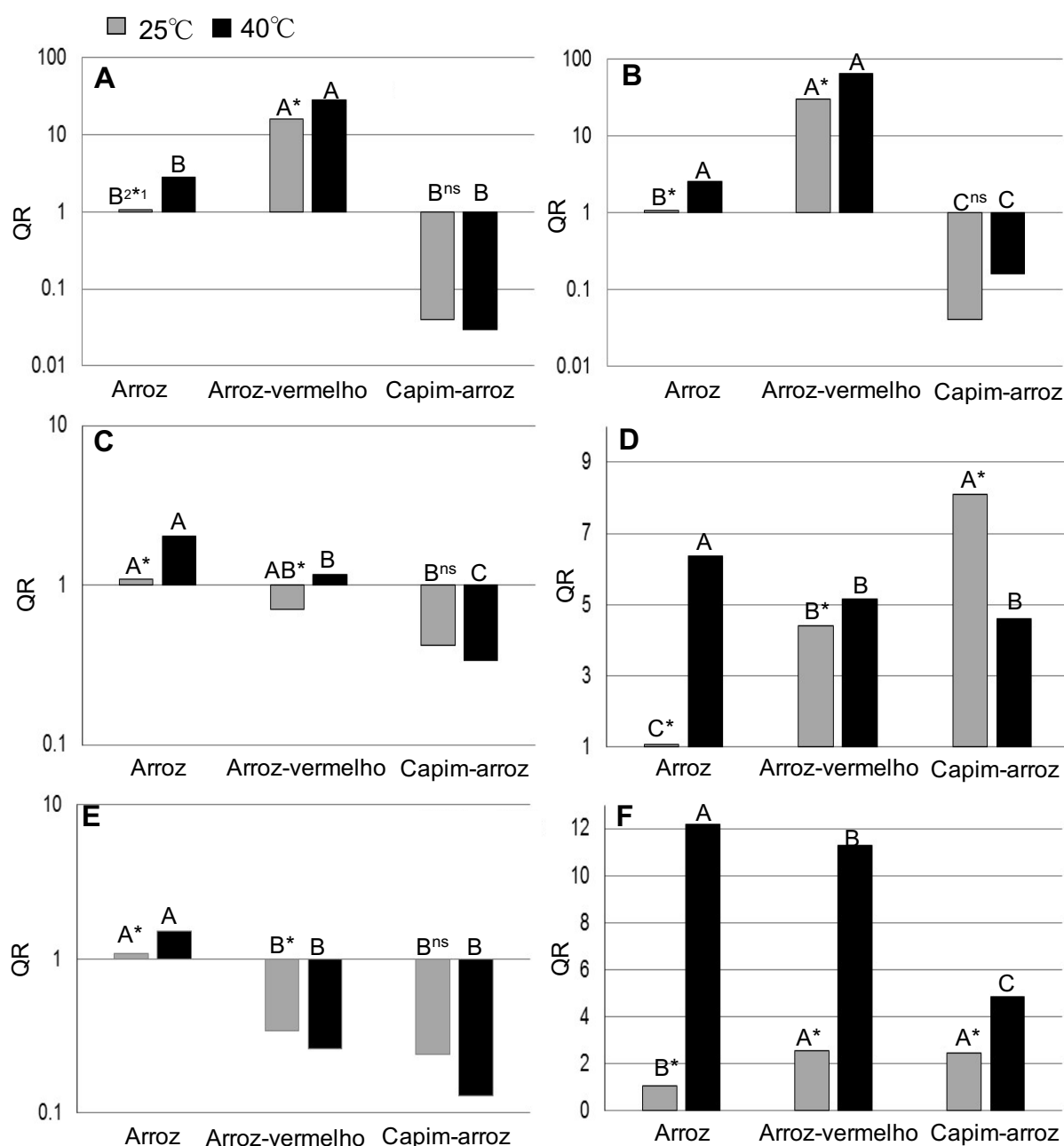


Figura 8 - Quanificação relativa (QR) da expressão do gene *OsAPX2* as 28 horas (A), gene *OsAPX2* as 32 horas (B), gene *OsHSP24.15* as 28 horas (C), gene *OsHSP24.15* as 32 (D), gene *OsHSP71.10* as 28 horas (E); e *OsHSP71.10* as 32 horas (F), em arroz, arroz-vermelho e capim-arroz expostos a temperatura de 25 e 40°C as.¹ * ou ns medias diferem ou não entre as temperaturas dentro de espécie, pelo teste t ($p \leq 0.05$).² Letras minúsculas comparam diferentes espécies dentro de temperatura pelo teste Duncan ($p \leq 0.05$). FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2015.

Às 32 horas de tratamento, o arroz e arroz-vermelho expressaram mais o gene *OsAPX2* quando expostos a temperatura de 40°C, o capim-arroz não teve diferença na expressão do gene (Figura 11B). O aumento na expressão da *OsAPX2* foi em torno 2,5 e 2 vezes para plantas de arroz e arroz-vermelho, respectivamente. Nessa época de avaliação verificou-se que a maior expressão do gene *OsAPX2* ocorreu em arroz-vermelho e a menor em capim-arroz, nas duas temperaturas testadas (Figura 11B). A expressão em plantas de arroz-vermelho destaca-se, pois foi 30 e 64 vezes superior ao tratamento referência (arroz a 25°C), quando expostos a temperatura de 25 e 40°, respectivamente.

A maior expressão do gene *OsAPX2* refletiu na maior atividade da enzima APX nas plantas de arroz e arroz-vermelho nas avaliações as 28 e 32 horas (Tabela 26 e 27), e decorre da maior concentração de H_2O_2 presente nos tecidos foliares das plantas C3, uma vez que a expressão dos genes *APX*, em diversas espécies, é regulada positivamente pela concentração de H_2O_2 (SAID; FINKA; GOLOUBINOFF, 2011).

A enzima APX é conhecida por desempenhar o papel mais importante na eliminação de EROs estando envolvida na eliminação do H_2O_2 e utilizando como o doador de elétrons o ascorbato (GILL; TUTEJA, 2010). Em arroz, a APX é uma pequena família de enzimas composta por oito isoformas (HONG et al., 2007), sendo a *APX2* localizada no citosol e induzida por salinidade, seca e alta temperatura (CAVERZAN et al., 2014; FRYER et al., 2003). Em *Arabidopsis* a família do gene *APX* foi induzida pelo estresse por alta temperatura e a expressão dos genes desta família esteve relacionada a tolerância ao estresse térmico (KOTAK et al., 2007).

Aproximadamente 5% do transcriptoma vegetal é regulado positivamente em resposta ao aumento de temperatura, sendo as HSPs uma parte importante da resposta das plantas ao estresse térmico (SAIDI; FINKA; GOLOUBINOFF, 2011). Proteínas HSPs controlam a sinalização celular, a dobramento, translocação e degradação de proteínas e também atuam para proteger as membranas celulares. Aumento da produção de HSPs ocorre quando as plantas são submetidas a aumentos abruptos ou graduais de temperatura resultando em estresse térmico. Existe variações consideráveis no padrão de expressão dos genes *HSPs* em diferentes espécies e até mesmo entre genótipos dentro da mesma espécie (BITA; GERATS, 2013).

Às 28 horas de tratamento o arroz e o arroz-vermelho expressaram mais o gene *OsHSP24.15* quando expostos a 40°C em relação a 25°C, observando-se que o arroz aumentou a expressão em 2 vezes e o arroz-vermelho em 1,6 (Figura 11C). O capim-arroz não teve a expressão afetada pela temperatura nessa época de avaliação. Em ambas as temperaturas o arroz teve a maior expressão do gene *OsHSP24.15* entre as plantas testadas e o capim-arroz a menor; contudo, o arroz-vermelho na temperatura de 25°C não diferiu das demais plantas (Figura 11C).

Na avaliação as 32 horas de tratamento observou-se que as três plantas tiveram a expressão do gene *OsHSP24.15* afetada pela diferença de temperatura, sendo que o arroz e arroz-vermelho aumentaram a expressão do gene quando expostos a alta temperatura, em cerca de 7 e 1,5 vezes respectivamente; e o capim-arroz reduziu a expressão nessa condição, em torno de 1,8 vezes (Figura 11D). Na temperatura de 25°C o arroz foi a planta que menos expressou o gene *OsHSP24.15* e o capim-arroz a que mais expressou, já na temperatura de 40°C o arroz expressou mais esse gene que as plantas daninhas (Figura 11D). Resultados que corroboram com os encontrados para arroz submetido a tratamento a 42°C, onde a expressão do gene *OsHSP24.15* aumentou significativamente a partir de três horas de tratamento (YE et al., 2012).

A proteína HSP24.15 faz parte da família conhecida com *small heat shock proteins* (sHSPs), a indução da expressão de genes das sHSPs e acúmulo dessas proteínas em plantas submetidas a estresse ambiental apontam que essas desempenhem papel importante na tolerância ao estresse principalmente ao térmico (BITA; GERATS, 2013; SUN et al., 2002). Algumas sHSPs associam-se a membrana, formando um complexo conhecido como "lipídio de choque térmico", que tem função de estabilizar as membranas no início do estresse térmico (HU et al., 2010). Desta forma, o aumento da expressão do gene *OsHSP24.15* em plantas de arroz e arroz-vermelho, pode ser visto como um mecanismo de defesa dessas plantas buscando proteger suas funções fisiológicas. A indução de sHSPs em cenoura e batata aumentou a termotolerância por elevar a estabilidade das membranas celulares (HU et al., 2010); enquanto que na avaliação de três genótipos de arroz, com diferença de tolerância a altas temperaturas, foi constatado maior acúmulo de sHSPs nos genótipos tolerantes comparado com o genótipo sensível e o genótipo com tolerância moderada apresentou concentração intermediária de sHSPs (JAGADISH et al., 2010).

A expressão do gene *OsHSP71.10*, às 28 horas de avaliação, foi maior em plantas de arroz na temperatura de 40°C em relação a 25°; o arroz-vermelho reduziu a expressão de gene nessa situação; e, para o capim-arroz não se verificou diferença (Figura 11E). O aumento no número de transcritos do gene *OsHSP71.10* em arroz foi de cerca de 50%, e a redução em arroz-vermelho foi próxima a 30%. Em ambas temperaturas testadas o arroz apresentou maior expressão do gene *OsHSP71.10* que as plantas daninhas estudadas (Figura 11E).

Às 32 horas após o tratamento todas as plantas aumentaram a expressão do gene *OsHSP71.10* quando expostas ao aumento de temperatura, sendo observado que a expressão foi aproximadamente 12; 6 e 2 vezes maior para arroz, arroz-vermelho e capim-arroz, respectivamente (Figura 11F). No tratamento à 25°C o arroz teve menor expressão do gene *OsHSP71.10* que as plantas daninhas; porém, no tratamento de 40°C arroz apresentou maior expressão e o capim-arroz a menor (Figura 11F).

As proteínas da família HSP70 são as primeiras HSP a acumularem no tecido vegetal em resposta a altas temperatura (FRAGKOSTEFANAKIS et al., 2015). O acúmulo de enzimas HSP70 foi relatada por auxiliar na translocação, proteólise, tradução, dobramento, agregação e re-enrolamento de proteínas desnaturadas (GORANTLA et al., 2007; ZHANG et al., 2010). Além de atuar na proteção do PSII e consequentemente na manutenção na cadeia de transporte de elétrons durante o estresse (WANG et al., 2015), tem papel importante na regulação positiva na defesa antioxidante enzimática ajudando indiretamente no controle de EROs (HU et al., 2010). Aumento da expressão do gene *HSP71.10*, como nas três espécies estudadas, foi documentado em tomates (BITA et al., 2011) e em diferentes variedades de uva em condição de alta temperatura, onde a variedade mais tolerante ao estresse teve maior expressão que as demais (ZHANG et al., 2005).

As análises moleculares demonstraram que as plantas, principalmente o arroz e o arroz-vermelho, aumentaram a expressão de genes responsáveis pela defesa das plantas ao estresse oxidativo e a danos estruturais nas células. Essa resposta molecular pode estar ligada ao aumento do estresse oxidativo observado nessas plantas, uma vez que há uma relação estreita entre o estresse oxidativo e a resposta das plantas submetidas a temperatura supra ótima. O peróxido de hidrogênio tem sido sugerido como necessário para a resposta ao estresse térmico, sendo que *Arabidopsis* a expressão dos genes *APX2*, *HSP17.6* e *HSP18.2* foi induzida pelo

aumento da concentração de H_2O_2 nos tecidos (VOLKOV et al., 2006). Em capim-arroz o qual não se observou mudanças nos parâmetros fisiológicos, verificou-se aumentou a expressão do gene *OsHSP70.10*, demonstrando que esse gene é responsivo ao estresse aumento de temperatura nas três plantas testadas e que o aumento da expressão desse pode ser mediada por outro sinalizador que não o H_2O_2 .

3.4 Conclusões

A temperatura de 40°C causa redução de fotossíntese, proteínas e pigmentos fotossintéticos e aumento do estresse oxidativo em plantas de arroz e arroz-vermelho; não se observa danos em plantas de capim-arroz submetidas a essa temperatura.

Em resposta a alta temperatura o arroz e arroz-vermelho aumentam a atividade do seu sistema antioxidante e a expressão dos genes *APX2*, *HSP24.15* e *HSP71.10*. Plantas de capim-arroz expostas a altas temperaturas, não modificam a atividade do seu sistema antioxidante e expressam mais o gene *HSP71.10*.

A utilização de dois genes normalizadores (*β -Tubulina* e *OsUBC-E2*) é suficiente para a análise quantitativa adequada de RT-qPCR em arroz, arroz-vermelho e capim-arroz expostos a supra ótima.

4 CAPÍTULO III – Interferência da qualidade de luz no desenvolvimento de plantas de arroz, arroz-vermelho e capim-arroz.

4.1 Introdução

O arroz tem grande importância econômica e cultural, sendo o principal alimento para mais da metade da população mundial. A China é o maior produtor mundial, seguida pela Índia e Indonésia (FAO, 2017), sendo que o Brasil ocupa a nona posição com a produção de 12 milhões de toneladas, e 2 milhões de hectares semeadas com esse cereal (CONAB, 2017). Apesar da posição de destaque no cenário mundial na produção de arroz, devido principalmente ao uso de cultivares com alto potencial produtivo, uso correto de fertilizantes e adoção de práticas culturais apropriadas, ainda não se atingiu patamar de produtividade considerado ideal para a cultura. Isso, em parte decorre do controle insatisfatório de plantas daninhas, destacando-se o arroz-vermelho (*Oryza spp.*) e o capim-arroz (*Echinochloa spp.*).

Essas espécies destacam-se dentre as ocorrentes na cultura do arroz por pertencerem à mesma família botânica e, por esse motivo competirem pelo mesmo nicho da cultura (AGOSTINETTO et al., 2010). O arroz-vermelho, por ser da mesma espécie do arroz cultivado, tem poucas opções de controle seletivo, podendo causar prejuízos à cultura de até 55% devido à competição. Os danos variam com o nível de infestação, condições edafoclimáticas características da cultivar, período de convivência com a cultura e biótipo encontrado na área (FLECK et al., 2008). O capim-arroz ocorre com grande frequência e distribuição em todas as regiões produtoras de arroz, sendo altamente competitivo com arroz, devido à sua adaptação a ambientes

alagados, grande produção de sementes, crescimento rápido e de mecanismo fotossintético C4 (GALON et al., 2007; MARAMBE; AMARASINGLE, 2002).

A competição entre cultura e planta daninha ocorre principalmente por luz, água e nutrientes (RAJCAN; SWANTON, 2001). O efeito direto da qualidade da luz sobre a fotossíntese e a ontogênese caracteriza esse recurso como mais importante no desenvolvimento e no crescimento das plantas (JIAO; LAU; DENG, 2007; MEROTTO Jr; FISCHER; VIDAL, 2009). No entanto, o efeito da luz sobre as plantas não está somente relacionado à magnitude de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos (PPFD) que atinge sua copa, mas também à qualidade e à duração da irradiância (SMITH, 2000).

Os sinais de luz são percebidos nas plantas através dos fitocromos, criptocromos e fototropinas (KEVEI; SCHAFER; NAGY, 2007). Os pigmentos das plantas absorvem luz nos comprimentos de ondas de 300 a 700 nm (luz violeta a vermelha), sendo que comprimentos de ondas entre 710 a 730 (vermelho distante) não são absorvidos, sendo refletidos ou transmitidos. Com isso, as alterações da razão entre a radiação vermelho/vermelho distante, essa alteração é percebida pelo fitocromo das plantas vizinhas, causando respostas anatômicas, morfológicas e fisiológicas nestas (MACEDO et al., 2011).

A luz no comprimento de onda do vermelho (600 a 700 nm) é o componente básico do espectro de luz para fotossíntese e crescimento das plantas. Luz vermelha quando aplicada isolada ou em combinação com lâmpadas branca aumentam o crescimento de alface e outros vegetais verdes, mas também ativam os seus sistemas antioxidantes (LIN et al., 2013; MIZUNO; AMAKI; WATANABE, 2011). Luzes com espectro no comprimento de onda do azul (440-476 nm) também vem sendo documentadas por afetar diretamente características das plantas, ativando os criptocromos e os sistemas de absorção correspondentes a esse espectro nas clorofilas e carotenoides, sendo que sua suplementação estimula o acúmulo de biomassa em plantas de alface e repolho chinês (LI et al., 2012; JOHKAN et al., 2010).

Na literatura existem diversos trabalhos sobre o efeito de luzes com diferentes comprimentos de onda na fisiologia, no crescimento e no desenvolvimento de hortaliças (BERGSTRAND et al., 2016; LI; TANG; XU, 2013), porém poucas informações existem sobre esse tema em grandes culturas e plantas daninhas. Desta forma, este trabalho foi conduzido com o objetivo de determinar a influência das luzes

vermelha e azul na fisiologia, crescimento e teor de pigmentos das plantas de arroz, arroz-vermelho e capim-arroz.

4.2 Material e Métodos

O experimento foi realizado em casa de vegetação e em câmaras de germinação pertencente ao Centro de Herbologia/CEHERB da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel/FAEM – Universidade Federal de Pelotas/UFPel. Em delineamento completamente casualizado, com quatro repetições, sendo conduzido em esquema fatorial. O fator A constou de três espectro de luzes (branca, vermelha e azul) e o fator B de três plantas [arroz (*Oryza sativa* cv. Puitá INTA-CL), arroz-vermelho (*Oryza* spp.) e capim-arroz (*Echinochloa* spp)].

Realizou-se experimento em casa de vegetação com fotoperíodo (tipo BODs) em delineamento completamente casualizado, com quatro repetições. Os tratamentos foram arranjados em esquema fatorial, onde o fator A constou de três espécies (arroz, arroz-vermelho e capim-arroz) e

As unidades experimentais constaram de potes com capacidade volumétrica de 750 mL, preenchidos de mistura de solo e substrato comercial (5:1), sendo o solo oriundo de lavoura orizícola, classificado como Planossolo Hidromórfico eutrófico solódico, pertencente à Unidade de Mapeamento Pelotas e o substrato da marca germinaPlant[®]. Semeou-se cerca de 10 sementes em cada pote e, sete dias após a emergência (DAE), realizou-se o desbaste, com população final de quatro planta por pote.

As plantas permaneceram na casa de vegetação até 10 DAE, sendo em seguida transferida para as câmaras de germinação equipadas com lâmpadas tipo diodo emissor de luz (LED). Todas as câmaras foram equipadas com luzes da cor branca e as com tratamento em diferentes espectros de luz eram suplementadas com luzes vermelhas ou azuis, sendo a intensidade de luz no interior das câmaras de 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. As câmaras foram mantidas na temperatura constante de 25°C e fotoperíodo de 12/12 horas.

Aos 30 dias após a transferência para as câmaras (DATC) foram realizadas avaliações de fotossíntese líquida (A), condutância estomática (gs), concentração de CO₂ subestomática (Ci) e taxa de transpiração (E) e calculadas a eficiência da carboxilação (EC), pela relação fotossíntese líquida/concentração de CO₂

subestomática, e eficiência do uso da água (EUA), pela relação fotossíntese líquida/taxa de transpiração. Para isso, foi utilizado um analisador de gases no infravermelho (IRGA), marca LI-COR, modelo LI-6400, sendo realizadas as mensurações no terço médio da última folha completamente expandida, com concentração de CO_2 dentro da câmara de $400 \mu\text{mol mol}^{-1}$, fluxo de fótons de $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, sendo contates o déficit de pressão de vapor (VPD) e a temperatura da folha.

Coletou-se 0,1 g de folhas de cada repetição para realização de análise de conteúdo de clorofilas a (Cha), clorofila b (Chb), clorofilas totais (Cht) e carotenoides totais (CR). A determinações destes pigmentos foram feitas pela metodologia proposta por Hiscox e Israelstam (1979), onde amostras de folhas com 0,1 g de massa fresca (MF) foram colocadas em tubos de ensaio e adicionado 3 mL do reagente dimetilsulfóxido (DMSO), sendo após incubado a 65°C por 45 min em banho-maria. Realizou-se agitação manual, adicionando-se mais 2 mL de DMSO, as reações foram estabilizadas por 30 segundos. A solução final contendo os pigmentos foi lida em espectrofotômetro nos comprimentos de onda 470, 645 e 663 nm a partir dos quais foi calculado os teores de clorofilas e carotenoides pela fórmula proposta por Lichtenthaler (1987), sendo os valores expressos em mg g^{-1} (MF).

Aos 30 DATC determinou-se a estatura das plantas, que foram medidas com auxílio de régua milimetrada, tomando-se o comprimento desde o nível do solo até o ápice das mesmas, com o limbo foliar distendido, sendo expressa em cm. Em seguida, as plantas foram coletadas, sendo determinada a área foliar (AF), com auxílio de medidor de área foliar, modelo LI 3200 C, sendo o valor obtido em cm^2 e convertido em $\text{cm}^2 \text{planta}^{-1}$; e a massa seca da parte aérea (MSPA) pela pesagem da parte aérea das plantas, após serem secas em estufa com circulação forçada de ar a 60°C por 72 horas, sendo expressa em g planta^{-1} .

Os dados foram analisados quanto à normalidade e à homocedasticidade e posteriormente submetidos a análise de variância ($p \leq 0,05$). Em sendo constatada significância estatística, o efeito de espécies espectro de luz e de foram avaliados pelo teste de Duncan ($p \leq 0,05$). A presença de correlação entre as variáveis dependentes do estudo foi analisada através do coeficiente de correlação de Pearson ($p \leq 0,05$). O qual mede o grau da correlação entre duas variáveis. O coeficiente de correlação Pearson varia de -1 a 1, o sinal indica direção positiva ou negativa do relacionamento e o valor sugere a força entre as variáveis

4.3 Resultados e Discussão

Observou-se interação entre os fatores planta e espectro de luz para as variáveis: A , g_s , C_i , E , EC , EUA , estatura, AF e $MSPA$ (Tabelas 37 e 38). Para o teor de pigmentos fotossintéticos Cha , Chb , Cht e CR observou-se apenas efeito isolado do fator planta (Tabela 39).

Quando crescendo em luz branca ou vermelhas as três plantas não apresentaram diferença quanto a A , já quando expostas a luz azul o arroz e o arroz-vermelho apresentaram maior A que o capim-arroz (Tabela 37). Para arroz e arroz-vermelho a suplementação com luz azul aumentou a A , enquanto para o capim-arroz não se verificou diferenças entre tratamentos de luz. Quando utilizada luz azul, a A em arroz aumentou em 135 e 123%, comparativamente ao uso de luz branca e vermelha, respectivamente. Já, em arroz-vermelho expostas a luz azul observou-se incremento de 270 e 180% na A , comparativamente as plantas expostas a luz branca e vermelha, respectivamente. A maior taxa fotossintética nas plantas de arroz e arroz-vermelho quando expostas a luz azul pode ser explicada devido a luz azul estar diretamente envolvida nos processos abertura de estômatos e fotossíntese das folhas (HEGGI; HALLIDAY 2005).

Somente quando expostas a luz azul as plantas diferiram quanto a g_s , sendo maior em plantas de arroz e a menor em capim-arroz, enquanto o arroz-vermelho não diferiu das demais plantas (Tabela 37). Plantas de arroz e arroz-vermelho tiveram maior g_s quando expostas à luz azul, enquanto o capim-arroz não teve a g_s modificada pelo espectro luminoso utilizado. Plantas de alface cultivadas sob luz azul, apresentaram maior g_s que as cultivadas sob luz vermelha ou verde, sendo que o aumento da g_s destas plantas está relacionado ao seu maior número de estômatos (MUNEER et al., 2014).

Quanto ao C_i , as plantas não diferiram quando em luz branca, porém, quando submetidas à luz vermelha o arroz apresentou menor C_i que as plantas daninhas e, em luz azul, o C_i foi maior para capim-arroz (Tabela 37). Plantas de arroz tiveram maior C_i quando expostas à luz branca, enquanto o arroz-vermelho o maior C_i foi em plantas submetidas à luz branca e vermelha e o capim-arroz não apresentou diferença no C_i nos diferentes espectros de luz.

Tabela 37 - Fotossíntese líquida (A), condutância estomática (g_s), concentração de CO_2 subestomática (C_i), taxa de transpiração (E), eficiência da carboxilação (EC) e eficiência do uso de água (EUA) de plantas de arroz, arroz-vermelho e capim-arroz expostas a luz branca, azul e vermelha. FAEM/UFPEL, Capão do Leão/RS, 2015.

Planta	Luz								
	Branca		Vermelha		Azul				
	A (μmol CO ₂ m ⁻² s ⁻¹)								
Arroz	¹ B	5,28	^{ns2}	B	5,57	^{ns}	A	12,43	a
Arroz-vermelho	C	4,61		B	6,07		A	17,07	a
Capim-arroz	^{NS}	4,47			6,50			6,05	b
CV(%)	17,81								
gs (mol H ₂ O m ⁻² s ⁻¹)									
Arroz	B	0,020	^{ns}	B	0,040	^{ns}	A	0,310	a
Arroz-vermelho	B	0,028		B	0,017		A	0,077	ab
Capim-arroz	^{NS}	0,028			0,018			0,017	b
CV(%)	14,0								
Ci									
Arroz	A	567,5	^{ns}	B	126,8	b	B	282,3	b
Arroz-vermelho	A	637,8		A	645,8	a	B	147,6	c
Capim-arroz	^{NS}	623,7			747,0	a		733,7	a
CV(%)	85,27								
E (mmol H ₂ O m ⁻² s ⁻¹)									
Arroz	B	0,462	b	B	0,756	^{ns}	A	5,090	a
Arroz-vermelho	B	0,762	a	B	0,373		A	1,471	b
Capim-arroz	A	0,869	a	B	0,589		B	0,593	c
CV(%)	40,69								
EC (μmol CO ₂ m ⁻² s ⁻¹)									
Arroz	B	0,018	^{ns}	B	0,037	a	A	0,058	b
Arroz-vermelho	B	0,007		B	0,018	b	A	0,078	a
Capim-arroz	^{NS}	0,007			0,005	c		0,008	b
CV(%)	166								
EUA (μmol CO ₂ [mmol H ₂ O] ⁻¹)									
Arroz	A	14,24	a	AB	8,23	^{ns}	B	3,42	b
Arroz-vermelho	B	6,38	b	A	22,68		B	11,74	a
Capim-arroz	^{NS}	5,20	b		13,75			10,69	a
CV(%)	54,16								

¹ médias antecedidas por letra maiúscula na linha ou seguidas pela mesma letra minúscula na coluna, não diferem pelo teste Duncan ($p \leq 0,05$). ²NS ou ^{ns} não significativo.

Em luz branca as plantas de arroz tiveram menor E que as plantas daninhas; em luz vermelha, as plantas não diferiram quanto a essa variável; já, quando expostas à luz azul a cultura apresentou maior E (Tabela 37). Arroz e arroz-vermelho apresentaram, em média, 8 e 3 vezes maior taxa transpiratória quando expostas à luz azul do que nos outros espectros de luz, respectivamente. O capim-arroz teve a maior E na luz branca, quando comparado às demais plantas. A maior E observada em arroz e arroz-vermelho, quando expostos a luz azul, é decorrente da maior g_s apresentada

por essas espécies nestas condições. Este comportamento também foi reportado para alface e pepino cultivados em luz azul quando comparado a outros espectros de luz (HOGEWONING et al., 2010; MUNEER et al., 2014).

Sob luz branca as plantas não diferiram quanto a EC; quando em luz vermelha o arroz apresentou maior EC; e, na luz azul o arroz-vermelho teve maior EC que as outras plantas testadas (Tabela 37). Observou-se aumento de EC de plantas de arroz e arroz-vermelho quando expostos a luz azul, quando comparada aos outros espectros luminosos, enquanto não se verificou diferença no capim-arroz quando exposto as diferentes luzes. EC é a relação entre A e C_i , portanto, como plantas de arroz e arroz-vermelho apresentaram alto A e baixo C_i quando submetidas a luz azul, observou-se o aumento do EC neste tratamento.

Quanto à EUA, verificou-se que quando expostos à luz branca o arroz apresentou maior eficiência que às plantas daninhas; quando exposta à luz azul observou-se menor eficiência da cultura em relação as nas plantas daninhas; e, quando as plantas foram expostas à luz vermelha estas não diferiram (Tabela 37). O arroz teve maior EUA quanto submetido à luz branca e menor em luz azul, sendo que plantas tratadas com luz vermelha não diferiram dos demais tratamentos. Arroz-vermelho teve maior EUA quando submetido a luz vermelha e, o capim arroz não teve EUA alterada pelo tratamento com diferentes espectros de luz.

Suplementação com luz azul resultou em abertura estomática nas plantas de arroz e arroz-vermelho, o que pôde ser verificado pelo aumento da g_s e E . A luz azul estimula a abertura estomática (MARTEN et al., 2010), principalmente por estar envolvida em dois aspectos centrais: os mecanismos osmorreguladores responsáveis pelos movimentos estomáticos e a ativação da proteína H^+ -ATPase, responsável pela absorção de íons nas células-guardas (INOUE; KINOSHITA, 2017). A luz azul estimula a absorção de íons e o acúmulo de solutos orgânicos no protoplasto das células-guardas o que ocasiona redução no potencial osmótico celular. Como consequência, ocorre a entrada de água na célula e o protoplasto das célula-guarda intumescce, o que leva a deformação das paredes celulares e ao aumento da fenda estomática (TAIZ; ZEIGER, 2013), sendo que a reposta estomática em plantas desempenha importante papel regulador das trocas gasosas nas folhas e a eficiência dessa regulação pode impactar a produtividade de culturas agrícolas.

Além de ser responsável pela abertura estomática, a luz azul estimula a fotossíntese das plantas, pois a clorofila absorve fortemente luz na região do azul

(aproximadamente 430 nm), esse fato foi observado em arroz e arroz vermelho. O aumento da A , resultou na redução da C_i , devido a elevação do consumo de CO_2 na planta, o que demonstra que luz azul proporciona ganhos quanto a assimilação de carbono em arroz e arroz-vermelho.

Suplementação com luz vermelha não ocasionou mudanças na condutância estomáticas nas plantas testadas, contudo arroz e arroz-vermelho quando cresceram sob luz vermelha apresentaram maior A . A luz vermelha estimula a fotossíntese, pois além de absover luz no espectro do azul as clorofilas absorvem luz no vermelho (aproximadamente 430 nm), contudo a absorção de luz azul excita as clorofilas a um estado energético mais elevado do que a luz vermelha, pois a energia dos fótons é maior quando os comprimentos de onda são mais curtos (TAIZ; ZEINGER, 2013).

A absorção de luzes vermelha e azul pelas plantas é de cerca de 90%, isso indica que os processos fotossintéticos, no geral, são bastante modificados por esses espectros de luz (OLLE; VIRSILE, 2013). Esse efeito foi observado em plantas de arroz e arroz-vermelho, contudo as plantas de capim-arroz, em geral, não tiveram seus parâmetros fotossintéticos afetados pelo espectro de luz no qual esse se desenvolveram.

Cabe ressaltar que os parâmetros fotossintéticos verificados foram baixos para as plantas de capim-arroz, o que não é comumente observado em experimentos desenvolvidos a campo ou casa de vegetação. Isso provavelmente decorra da baixa intensidade de luz à qual as plantas ficaram expostas dentro das câmaras de crescimento. A luminosidade dentro das câmaras era de cerca de $200 \mu\text{mol}^{-2} \text{s}^{-1}$, ou seja, aproximadamente 20% do que é observado nas condições de crescimento a campo dessas plantas. Ainda, o capim-arroz tem rota fotossintética C_4 , o que a difere das demais espécies testadas. Plantas C_4 são adaptadas a ambientes quentes e com alta luminosidade e quando expostas à baixa intensidade de luz apresentam parâmetros fotossintéticos abaixo do esperado, sendo que os processos fotossintéticos são determinados predominantemente pela intensidade de luz (OLLE; VIRSILE, 2013), ou seja, a intensidade de luz foi mais limitante para a fotossíntese do capim-arroz que das demais plantas testadas.

Tabela 38 - Estatura (cm), área foliar ($\text{cm}^2 \text{ planta}^{-1}$) e massa seca da parte aérea (mg planta^{-1}) de plantas de arroz, arroz-vermelho e capim-arroz expostas a luz branca, azul e vermelha. FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2015.

Planta	Luz								
	Branca			Vermelha			Azul		
	Estatura (cm)								
Arroz	¹ B	24,69	ns ²	AB	26,50	a	A	30,50	b
Arroz-vermelho	B	23,40		B	24,87	ab	A	31,13	a
Capim-arroz	NS	21,44			20,35	b		18,34	c
CV(%)	13,93								
Área foliar (cm ² planta ⁻¹)									
Arroz	B	10,50	c	A	14,54	b	A	13,89	b
Arroz-vermelho	B	19,94	b	B	21,02	b	A	33,53	a
Capim-arroz	NS	32,51	a		30,99	a		33,25	a
CV(%)	15,09								
Massa seca da parte aérea (mg planta ⁻¹)									
Arroz	B	66,46	c	A	96,25	b	A	94,38	b
Arroz-vermelho	B	131,25	b	B	132,50	b	A	255,00	a
Capim-arroz	NS	232,50	a		221,46	a		256,88	a
CV(%)	16,19								

¹ médias antecedidas por letra maiúscula na linha ou seguidas pela mesma letra minúscula na coluna, não diferem pelo teste Duncan ($p \leq 0,05$). ²NS ou ^{ns} não significativo.

Quanto à variável de crescimento estatura, não se verificou diferença entre espécies quando submetidas à luz branca; quando tratadas com luz vermelha, a maior estatura foi do arroz, sendo que o arroz-vermelho não diferiu das outras plantas testadas; e, quando em luz azul a maior estatura foi do arroz-vermelho (Tabela 38). Plantas de arroz e arroz-vermelho tiveram maior estatura quando expostas à luz azul, porém em arroz não se verificou diferença entre as plantas tratadas com luz vermelha e os demais espectros testados; o capim-arroz não teve a estatura afetada pelos tratamentos de luz.

Para AF e MSPA, observou-se que em luz branca e vermelha o capim-arroz apresentou maior valor para as variáveis que as demais plantas testadas. Ainda, verificou-se que o arroz e arroz-vermelho diferiam quanto a estas variáveis quando tratados com luz branca, sendo que o arroz teve menor AF e MSPA que a planta daninha (Tabela 38). De modo similar, quando tratados com luz azul o arroz teve menor AF e MSPA que ambas a daninhas testadas, sendo que arroz-vermelho e capim-arroz não diferiram.

O arroz teve aumento em estatura, AF e MSPA, quando cresceu sob luz vermelha ou azul em relação à branca, sendo esse incremento de em torno de 24, 35 e 43%, respectivamente. Já arroz-vermelho aumentou a estatura, AF e MSPA, quando

submetido à luz azul em comparação as demais luzes testadas. Para o capim-arroz nenhuma das variáveis morfológicas foi modificada pelos tratamentos com diferentes espectros de luzes.

Os resultados indicam que as luzes vermelha e azul foram eficientes em aumentar a biomassa das plantas de arroz, contudo somente a luz azul teve efeito sobre o arroz-vermelho. Luz vermelha e azul são importantes nos processos de expansão foliar e, conseqüentemente, no acúmulo de biomassa (LI et al., 2010; JOHKAN et al., 2010). Estudos anteriores apontam que alface cultivada sob luz azul tem maior estatura, expansão foliar, incremento na área foliar e biomassa que a cultivadas sob outros espectros de luz (HOGEWONING et al., 2010, JOHKAN et al.; 2010; LI et al 2010), assim como o espectro de luz azul foi eficiente em aumentar a alongação dos estames de petúnias, berinjela e girassol (BERGSTRAND et al., 2014, FUKUDA et al., 2013).

A estrutura e a fisiologia das plantas são particularmente reguladas pelos sinais de luz do ambiente. A qualidade de luz modifica tanto respostas fisiológicas primárias das plantas durante a fotossíntese quanto seu crescimento e desenvolvimento (KIM et al., 2013; RAJU et al., 2013). Devido a isso, as plantas desenvolveram mecanismo sofisticado para adaptar suas morfologia e fisiologia à luz do ambiente. Assim, quando são expostas a espectro de luz diferente tendem a se aclimatar a esse ambiente, sendo que essa aclimação pode ocorrer de várias formas, como mudança de tamanho de folhas, espessura foliar, teor de pigmentos, número de estômatos e posicionamento foliar (BERGSTRAND et al., 2016).

Embora as plantas de capim-arroz apresentaram baixa taxa fotossintética (Tabela 37), em média, obtiveram maior AF e MSPA (Tabela 38), que o arroz e o arroz-vermelho. Segundo Bergstrand et al. (2016) a intensidade baixa de luz pode causar aumento na área foliar das plantas, uma vez que essa adaptação maximiza a captura de luz disponível e supre a demanda da fotossíntese.

As luzes vermelha e azul são absorvidas nas plantas por diferentes pigmentos, e por esse motivo, podem induzir respostas fisiológica distintas. A luz azul é absorvida, em grande parte pelos criptocromos, que são reportados principalmente por regular o ritmo circadiano das plantas, alongamento do caule e produção de auxinas (FUKUDA et al., 2012). Por sua vez, a luz vermelha é absorvida pelas fototropinas que são responsáveis pelo movimento cloroplasmático, maximizando, assim, a absorção de luz (CHRISTIE, 2007).

Quanto ao teor de pigmentos fotossintéticos, o arroz apresentou maior teor de Cha, Chb, Cht e CR que as plantas daninhas, não diferindo do arroz-vermelho para Chb, sendo que o capim-arroz teve menor teor em todos os pigmentos analisados (Tabela 39). Esse resultado parece ser intrínseco de cada planta, devido à história evolutiva de cada espécie, sendo que o teor de pigmentos fotossintéticos pode ser bastante variável, dependendo de espécie, genótipo e ambiente (FUKUDA, 2013).

Tabela 39 - Teores de clorofila a (Cha), clorofila b (Chb), clorofila totais (Chtot) e carotenoides (CR) em folhas de plantas de arroz, arroz-vermelho e capim-arroz. FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2015.

	Arroz	Arroz-vermelho	Capim-arroz	CV (%)
Cha (mg g ⁻¹ MF ²)	1,33 a ¹	1,02 b	0,80 c	19,93
Chb (mg g ⁻¹ MF)	0,51 a	0,47 a	0,18 b	56,02
Chtot (mg g ⁻¹ MF)	1,91 a	1,58 b	1,05 c	18,58
CR (mg g ⁻¹ MF)	0,49 a	0,32 b	0,22 c	21,96

¹médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha, não diferem significativamente pelo teste Duncan (p≤0,05). ²MF= massa fresca

Ao contrário do esperado, não foi observada relação entre o espectro de luz no qual as plantas cresceram e o teor de pigmento nas suas folhas, contudo existem resultados controversos na bibliografia a esse respeito, uma vez que foi reportado aumento de clorofilas a, b e carotenoides em brássicas que cresceram em luz branca suplementada com luz vermelha ou azul (LEFSRUD, 2008). Por outro lado, não se observou acúmulo de pigmentos em folhas de plantas de rabanetes quando essas se desenvolveram sob suplementação de luz azul e vermelha, em relação à luz branca (LI et al., 2013b).

A respostas de plantas à luz é bastante complexa, pois tem influência em todos os processos fisiológicos, tendo relação estreita com a produção de fitohormônios (XIAOYING et al., 2007). Radiação rica em fótons na região do 460nm e 660 nm, apesar de relatada como ideal para a fotossíntese (Mc CREE, 1972), pode não ser a ideal para o crescimento e o desenvolvimento das plantas, uma vez que leva em consideração uma folha isolada. Contudo, quando observado as plantas completa, verifica-se a existência da luz transmitida das folhas do topo e que é absorvida pelas folhas da base contribuindo assim para a fotossíntese total (MASSA et al., 2015). Ainda, se for considerado uma comunidade de plantas deve-se observar as relações

que existem entre plantas, pois estas são diretamente mediadas pela qualidade de luz. Por esse motivo, trabalhos ainda devem ser conduzidos para elucidar o efeito da qualidade da luz no crescimento e no desenvolvimento e na interação de culturas e plantas daninhas.

Analisando-se a correlação de Pearson verificou-se que das 78 possíveis correlações, 38 foram significativas, ou seja, 48%, sendo que destas 65% apresentaram correlação positiva e 35% correlação negativa (Tabela 40). Destas cabe ressaltar a correlação positiva entre taxa fotossintética e estatura, o que indica que as plantas aumentaram a estatura buscando interceptar mais luz e, assim, aumentar a taxa fotossintética. No caso da estatura, foi observado correlação negativa com MSPA, isso pode ser devido à baixa intensidade luminosa no interior das câmaras, conforme discutido anteriormente. Para estatura observou-se correlação positiva com a maior parte dos pigmentos fotossintéticos, já as variáveis AF e MSPA demonstraram correlação negativa com esses pigmentos. Isso, aponta que as plantas estavam se adaptando ao ambiente no interior da câmara.

Tabela 40 - Correlação de Pearson entre as variáveis taxa fotossintética (A), condutância estomática (gs), concentração subestomática de CO₂ (Ci), transpiração (E), eficiência de carboxilação (CE), eficiência do uso da água (EUA), estatura (Est), área foliar (AF), massa seca da parte aérea (MSPA), clorofila a (Cha), b (Chb), total (Chtot) e carotenoides (CR) na média em arroz, arroz-vermelho e capim-arroz em diferentes qualidades de luz. FAEM/UFPEl, Capão do Leão/RS, 2015.

	A	gs	Ci	E	EC	EUA	Est	AF	MSPA	Cha	Chb	Chtot	CR
A	1,00												
gs	0,62* ¹	1,00											
Ci	-0,55 ^{ns}	-0,30 ^{ns}	1,00										
E	0,59*	0,99*	-0,32 ^{ns}	1,00									
EC	0,71*	0,14 ^{ns}	-0,51*	0,15 ^{ns}	1,00								
EUA	0,13 ^{ns}	0,34*	0,31 ^{ns}	0,40*	0,02 ^{ns}	1,00							
Est	0,56*	0,41*	-0,57*	0,42*	0,52*	-0,15 ^{ns}	1,00						
AF	0,14 ^{ns}	-0,25 ^{ns}	0,20 ^{ns}	-0,24 ^{ns}	0,22 ^{ns}	0,04 ^{ns}	-0,25 ^{ns}	1,00					
MSPA	-0,05 ^{ns}	-0,27 ^{ns}	0,34 ^{ns}	-0,25 ^{ns}	-0,01 ^{ns}	-0,02 ^{ns}	-0,50*	0,95*	1,00				
Cha	0,04 ^{ns}	0,33 ^{ns}	-0,25 ^{ns}	0,33 ^{ns}	-0,20 ^{ns}	-0,07 ^{ns}	0,26 ^{ns}	-0,67*	-0,72*	1,00			
Chb	0,49*	0,24 ^{ns}	-0,41*	0,25 ^{ns}	0,49*	-0,09 ^{ns}	0,55*	-0,27 ^{ns}	-0,40*	0,38*	1,00		
Cht	0,25 ^{ns}	0,34 ^{ns}	-0,48*	0,35*	0,12 ^{ns}	-0,17 ^{ns}	0,46*	-0,67*	-0,70*	0,81*	0,79*	1,00	
CR	0,26 ^{ns}	0,42*	-0,52*	0,41*	0,32 ^{ns}	-0,20 ^{ns}	0,41*	-0,62*	-0,70*	0,85*	0,46*	0,73*	1,00

¹ * significativo e ^{ns} não significativo p≤0,05

4.4 Conclusões

O arroz tem sua fisiologia e crescimento afetados positivamente pela luz azul, já a luz vermelha aumenta apenas as variáveis morfológicas da cultura. O arroz-vermelho apresenta incremento nas variáveis de crescimento somente quando exposto a luz azul. O capim-arroz não tem variáveis fisiológicas e morfológicas afetadas pelo espectro luminoso no qual se desenvolve.

Nas três condições luminosas testados o capim-arroz apresenta maior crescimento que o arroz e o arroz-vermelho, exceto na luz azul na qual o capim-arroz e o arroz-vermelho não diferem quanto as variáveis de crescimento.

5 CAPÍTULO IV – Impacto do aumento de CO₂ no custo de adaptação de *Echinochloa colona* com resistência múltipla a herbicidas.

5.1 Introdução

As mudanças climáticas incluem principalmente o aumento gradual na concentração de CO₂, os níveis de CO₂ subiram de 280 no período pré-industrial para atuais 400 µL L⁻¹ e, de acordo com previsões, a concentração de CO₂ pode chegar a 700 µL L⁻¹ até o fim desse século (IPCC, 2017).

O incremento de carbono primário (C) pode afetar o metabolismo, o crescimento e o desenvolvimento das plantas. Plantas C3, devido à sua anatomia foliar, parecem responder mais ao aumento da concentração atmosférica de CO₂ do que plantas C4 (BOWES, 1993). Contudo, estudos realizados nas últimas décadas apontam que tanto culturas quanto plantas daninhas com rota fotossintética C4 respondem ao aumento da concentração de CO₂ (ZISKA; BUNCE, 2007).

As plantas daninhas do gênero *Echinochloa* são usualmente reportadas por causarem sérios danos econômicos em culturas em todo mundo (BAJWA et al., 2015), caracterizando-se por serem plantas com rota fotossintética C4, polimórficas e hexaplóides (2n= 6x=54) (YABUNO, 1962). No Brasil, o gênero *Echinochoa* ocorre em grande frequência nas lavouras produtoras de arroz (ANDRES et al., 2007). O efeito negativo de sua presença deve-se à alta capacidade de competição por recursos limitantes, à dificuldade de controle, ao acamamento da cultura, além da ocorrência de biótipos resistentes a determinados herbicidas (LOPEZ-MARTINEZ; MARSHALL; DE PRADO, 1999).

Dentre as espécies do gênero *Echinochloa*, o *E. colona* (L.) Link destaca-se como importante planta daninha em culturas de verão em mais de 60 países (ALARCON-REVERTE et al., 2014), principalmente em lavouras de arroz (BAJWA et al., 2015). A espécie é considerada altamente competitiva e estudos reportam grandes perdas na produtividade de culturas resultante da infestação por essa planta daninha (CHANDER; DARYAEL; AGGARWA, 2008).

As populações de *E. colona* têm demonstrado diferentes graus de resistência nos Estados Unidos (EUA), Austrália, Ásia, América Latina e Espanha (HOAGLAND et al., 2004; VALVERDE, 2007; KIM et al., 2000; WIDDERICK et al., 2013), sendo que essa resistência envolve diferentes herbicidas incluindo propanil, quincloraque, bispiribaque-sódico, imidazolinonas e nicosulfuron. Nos EUA, há relato de biótipo com resistência múltipla a imazapir, propanil e quincloraque no estado do Arkansas (HEAP, 2017).

Plantas resistentes podem ter menor adaptabilidade ao ambiente (*fitness*) mesmo na ausência da aplicação do herbicida, decorrente do efeito pleotrópico negativo dos alelos de resistência sobre características competitivas e/ou reprodutivas da planta (VILA-AIUB; GUNDEL; PRESTON, 2015). Este fato já foi observado em espécies, como *Setaria italica*, *Alopecurus myosuroides* e *Oryza sativa* com resistência à triazina, ACCase e ALS, respectivamente, devido a alterações no local de ação do herbicida (DARMENCY, H.; PERNES, 1989; MENCHARI et al., 2008; SHA; LINScombe; GROTH, 2007), além de plantas *Lolium rigidum* com resistência múltipla a herbicida, devida, a metabolização via P450 (VILA-AIUB et al., 2005).

Conhecer as respostas biológicas, fisiológicas e moleculares dos biótipos quando expostos a diferentes ambientes é fundamental para prever o impacto da resistência na população de plantas daninhas, principalmente diante da previsão de intensas mudanças climáticas para os próximos anos. Desta forma, o estudo foi realizado com o objetivo de avaliar o efeito de níveis de CO₂ em biótipos de *E. colona* com resistência múltipla aos herbicidas quincloraque, propanil, cialofope-butilico e glufosinato de amônio.

5.2 Material e Métodos

Foram conduzidos dois experimentos na University of Arkansas (UARK), localizada na cidade de Fayetteville, em câmaras de crescimento tipo fitotron. O

primeiro experimento visou avaliar o efeito do CO₂ sobre as variáveis fotossintéticas, morfológicas e reprodutivas das plantas, sendo conduzido em esquema completamente casualizado, com seis repetições. Os tratamentos foram organizados em fatorial onde o fator A constou de concentrações de CO₂ (400 e 700 µL L⁻¹) e o fator B de biótipos de *E. colona* (suscetível e resistente). O biótipo resistente utilizado apresenta resistência múltipla aos herbicidas quincloraque e propanil e resistência de baixo nível a cialofope-butilico e a glufosinato amônio, enquanto o biótipo suscetível é oriundo da mesma população do resistente.

As unidades experimentais constaram de potes com capacidade volumétrica de 3,5L, preenchido com solo. Foram semeadas dez sementes, sendo efetuado desbaste aos sete dias após a emergência (DAE), estabelecendo-se população final de uma planta por pote. As câmaras foram mantidas na temperatura de 34/26 °C e fotoperíodo de 14/10 horas (dia/noite).

Semanalmente, até os 123 DAE, foi avaliada a estatura e realizada a contagem do número de afilhos das plantas. A estatura foi mensurada com auxílio de régua milimetrada, tomando-se o comprimento desde o nível do solo até o ápice das mesmas, com o limbo foliar distendido.

No início do florescimento (80 DAE), avaliou-se as variáveis fotossintéticas: fotossíntese líquida (A), condutância estomática (gs), concentração de CO₂ subestomática (Ci) e taxa de transpiração (E) e foram calculadas a eficiência da carboxilação (EC), pela relação fotossíntese líquida/concentração de CO₂ subestomática, e eficiência do uso da água (EUA), pela relação fotossíntese líquida/taxa de transpiração. Para isso, foi utilizado analisador de gases no infravermelho (IRGA), marca LI-COR, modelo LI-6400, sendo realizadas as mensurações no terço médio da última folha completamente expandida, com concentração de CO₂ dentro da câmara de 400 ou 700 µmol mol⁻¹ (dependendo do tratamento de CO₂), fluxo de fótons de 1000 µmol m⁻² s⁻¹, sendo contates o déficit de pressão de vapor (VPD) e a temperatura da folha.

Determinou-se a área foliar (AF), a massa seca da parte aérea (MSPA) e a massa seca de raiz (MSR), aos 80 DAE, sendo que para essas avaliações foram utilizadas três repetições. A AF foi determinada com auxílio de medidor de área foliar, modelo LI3100, sendo o valor obtido em m², enquanto a MSPA e MSR foram quantificadas pela pesagem da parte aérea e das raízes das plantas, respectivamente,

após serem secas em estufa com circulação forçada de ar a 60°C por 72 horas e expressa em g planta⁻¹.

As três repetições restantes foram cultivadas até à maturação das sementes (123 DAE), onde se determinou os números de panículas por planta, e de sementes por panícula, a massa de mil sementes e a produtividade total por planta. Após a colheita das sementes, foi realizado o teste de germinação, sendo utilizadas 600 sementes (seis repetições de 100), as quais foram semeadas sobre folha de papel germitest, umedecida previamente com água destilada, as amostras foram acondicionadas em caixas tipo gerbox, sendo estas cobertas por plástico filme. Os gerbox foram mantidos em câmara de germinação à temperatura de 32°C e fotoperíodo de com 12/12 horas. Para obtenção dos resultados foram realizadas duas contagens, sendo a primeira aos quatro dias e a segunda aos 10 de semeadura. As sementes que não germinaram foram submetidas a solução a 1% p/v de 2-3-5 trifenil cloreto de tetrazólio para verificação da viabilidade, sendo realizada a análise após dois dias de incubação. Os resultados de germinação e viabilidade das sementes foram expressos em porcentagem (BRASIL, 2009).

Buscando identificar a nível molecular o efeito do CO₂ nos diferentes biótipos, foi conduzido o segundo experimento, com delineamento experimental e tratamentos idênticos ao primeiro, porém com quatro repetições. As unidades experimentais constaram de potes de capacidade volumétrica de 500 mL, preenchidos com solo, onde foram semeadas 10 sementes dos biótipos, sendo, aos 7 DAE, realizado desbaste mantendo-se a população de uma planta por pote. As plantas cresceram nas mesmas condições experimentais do primeiro experimento.

Realizou-se a análise da expressão dos genes ribulose-1,5-bisphosphate carboxilase/oxygenase-small subunit (*EcRbcS1*), glutathione S-transferase (*EcGST1*), superóxido dismutase cu/zn (*EcSODcu/zn*), citocromo p450 (*CYP81A12*) e o fator iniciador de tradução (*Elf-4b*), sendo os pares de primers dos três primeiros genes desenhados a partir de sequências depositadas no National Center for Biothnology Information (NCBI) e, com uso do programa Primer3[®], os demais pares de primers tiveram a sequência retirada da literatura (Tabela 41). O gene da enzima de conjugação de ubiquitina E2 (*OsUBC-E2*) foi utilizado como gene endógeno (JAIN et al., 2006).

Aos 45 DAE, realizou-se a coleta do material vegetal e imediata extração de RNA total, onde aproximadamente 0.1g de material vegetal foi macerado em

nitrogênio líquido e em seguida adicionado 1mL de Trizol® (Invitrogen™), seguindo indicações do fabricante. As amostras foram centrifugadas a 12000 *rpm* durante 15 min a 4°C, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo, onde foi adicionado 100 µL de clorofórmio, agitando-se no vortex por 15 segundos e em seguida os tubos foram incubados por 5 minutos a temperatura ambiente e novamente centrifugados a 12000 *rpm* durante 15 minutos, a 4°C. A fase aquosa resultante da centrifugação foi transferida para novo tubo, onde se adicionou 500 µL de isopropanol, os tubos foram submetidos à agitação manual e, em seguida, incubados por 10 minutos em temperatura ambiente, sendo então centrifugados a 12000 *rpm* por 15 minutos a 4°C. Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o precipitado submetido à lavagem com 1 mL de etanol 70%, os tubos foram então centrifugados a 12000 *rpm* por 5 minutos a 4°, sendo o sobrenadante descartados. Em seguida, os tubos foram levados a concentrador a vácuo por 5 minutos, a temperatura ambiente. Por fim, os pellets foram ressuspensado com 35µL de água tratada com dietil pirocarbonato (DEPEC) e resfriados a -86°C até quantificação.

Tabela 41 - Primers utilizados para RT-qPCR dos biótipos de *E. colona* suscetível e resistente a herbicidas crescendo nas concentrações de 400 e 700 µL L⁻¹ de CO₂, suas respectivas eficiências e temperaturas de Melt (TM). UARK, Fayetteville/AR/EUA, 2016.

Gene	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')	Eficiência (E)	TM (°C)	Referência
<i>EcRbcS1</i>	AGAACTCCAG	GCACTGTGTC	2,19	87	KC478601.1
	GTCCCCTTGT	TGCCTGATGT			
<i>EcGST1</i>	ATTCCAGCTT	TGCAAACCAA	2,11	80,5	JX122857.1
	TTGTGGATGG	TAACGGCATA			
<i>EcSODcu/zn</i>	GATCTTGGA	AGTGCTCTTG	2,13	84	JX284413.1
	ATGTGACAGC	CTCAGCTCAT			
<i>EcCYP81A12</i>	GTGTAGAGGGG	TGCGAAGGT	2,01	72,5	IWAKAMI et al., (2014).
	TTTGTATGAACG	AACAAATTGC			
<i>Elf-4b</i>	CCAGTCCCTTT	CTACAGCATACA	2,20	76	IWAKAMI et al., (2014).
	TTGTTTTGGA	GAGGTGATCAAT			
<i>OsUBC-E2</i>	CCGTTTGTAGA	AGGTTGCCTGAGT	2,13	81,5	JAIN et al., (2006).
	GCCATAATTGCA	CACAGTTAAGTG			

A quantificação do RNA total foi realizada através de Nanodrop™, e a qualidade confirmada por eletroforese em gel de agarose 2%. Em seguida as amostras foram

submetidas a tratamento com DNase (Thermo™), a e síntese de cDNA com uso de Reverse Transcription System® (Promega™), seguindo indicações dos fabricantes.

Para o RT-qPCR foi utilizado o equipamento BioRad CFX96™ Real Time PCR Detection Systems. Para a reação de amplificação utilizou-se o volume total de 12µL, contendo 6,25µL de iQ™ SYBR® Green Supermix (BioRad™), 0,5µL de primer (10mM), 1µL de cDNA (0.2 µg) e 4,25µL de água. As condições de amplificação foram: 95°C (2 minutos), seguidos de 40 ciclos; desnaturação a 95°C (15 segundos); 58°C (1 minuto); e 72°C (20 segundos), seguido pela curva de Melt com variação de 65°C a 95°C, com incremento de 0,5°C durante 5 minutos.

Todas as reações foram realizadas em triplicata, a eficiência da PCR foi obtida a partir de quatro diluições seriadas de cDNA (1:1; 1:5; 1:25 e 1:125) para gerar a curva padrão de cada par de primer testado. O valor E foi estimado pela equação $E = 10^{(-1/\text{slope})}$, sendo considerado aceitáveis valores de eficiência entre 1,8 e 2,2 (Tabela 1). Para a quantificação relativa dos genes utilizou-se a diluição 1:25, sendo realizado o cálculo de expressão relativa através do método ΔCt , pela equação $\Delta\Delta\text{Ct} = (\text{Ct}_{\text{alvo}} - \text{Ct}_{\text{UBC-E2}}) - (\text{Ct}_{\text{calibrador}} - \text{Ct}_{\text{UBC-E2}})$, onde o $\Delta\Delta\text{Ct}$ é a expressão relativa do gene e o calibrador o tratamento biótipo suscetível a 400 µL L⁻¹ e a aplicação do resultado em $2^{-(\Delta\Delta\text{Ct})}$ fornece a dimensão de variação.

Os dados foram analisados quanto à normalidade e à homocedasticidade e posteriormente submetidos à análise de variância ($p \leq 0,05$). Em sendo constatada significância estatística, o efeito de concentração de CO₂ e de biótipo foram comparados pelo teste de t ($p \leq 0,05$).

5.3 Resultados e Discussão

Observou-se interação entre os fatores [CO₂] e biótipo para as variáveis estatura e número de afilhos (Tabela 42 e Figura 12). As maiores estaturas, para ambos os biótipos, foram observadas quando esses cresceram em ambiente com 700, em comparação com 400 µL L⁻¹ de CO₂. As estaturas máximas para a concentração de 400 µL L⁻¹ foram de 163 e 178 cm para os biótipos suscetível e resistente, respectivamente. Já, para as plantas que cresceram a 700 µL L⁻¹, a estatura máxima foi de 205 cm para ambos os biótipos, ou seja, a estatura foi 25 e 15% superior para os biótipos suscetível e resistente cultivadas em alta [CO₂], respectivamente. Plantas de cana-de-açúcar quando cultivadas em 720 µL L⁻¹ de CO₂ tiveram incremento de

17% em estatura comparativamente a plantas cultivadas em $[\text{CO}_2]$ ambiente (DE SOUZA et al., 2008). Ainda, verificou-se para o biótipo suscetível que a estatura das plantas que cresceram na maior $[\text{CO}_2]$ foi superior a partir dos 56 DAE comparativamente com a menor $[\text{CO}_2]$, enquanto, para plantas resistentes a diferença começou a ser observada a partir dos 21 DAE (Tabela 42).

Tabela 42 - Estatura de plantas de E. colona suscetível e resistente cultivadas nas concentrações de 400 e 700 $\mu\text{L L}^{-1}$ de CO_2 . UARK, Fayetteville/AR/EUA, 2016.

Estatura (cm)												
Concentração de CO ₂												
DAE	400 (μL L ⁻¹)						700 (μL L ⁻¹)					
	Suscetível			Resistente			Suscetível			Resistente		
7	A ¹	13,53	a ²	A	8,33	a	A	17,63	a	A	11,33	a
14	A	34,10	a	A	28,50	a	A	40,50	a	A	35,23	a
21	B	43,47	a	B	38,03	a	A	58,73	a	A	56,97	a
28	A	60,73	a	B	55,70	a	A	66,07	b	A	75,03	a
35	A	75,17	a	B	60,47	a	A	80,30	a	A	87,00	a
42	A	101,33	a	B	90,33	a	A	113,53	a	A	112,37	a
49	A	120,17	a	B	113,33	b	A	129,53	a	A	133,27	a
56	B	122,00	a	B	124,33	a	A	137,67	b	A	152,16	a
64	B	122,33	a	B	126,00	a	A	152,00	a	A	162,00	a
70	B	124,00	b	B	137,67	a	A	160,67	a	A	166,33	a
81	B	148,00	b	B	168,67	a	A	192,33	a	A	182,33	a
88	B	166,33	b	B	178,33	a	A	195,00	a	A	198,33	a
95	B	165,67	b	B	178,00	a	A	201,00	a	A	205,00	a
102	B	166,33	b	B	178,67	a	A	205,00	a	A	205,33	a
109	B	166,33	b	B	178,67	a	A	205,00	a	A	205,33	a
116	B	166,33	b	B	178,67	a	A	205,00	a	A	205,33	a
123	B	166,33	b	B	178,67	a	A	205,00	a	A	205,33	a
CV (%)						4.19						

¹ Letras maiúsculas comparam diferentes $[\text{CO}_2]$ para o mesmo biótipo, ² letras minúsculas comparam biótipos suscetível e resistente na mesma $[\text{CO}_2]$ pelo teste de t ($p \leq 0,05$).

Na concentração de 400 $\mu\text{L L}^{-1}$ o biótipo resistente teve maior estatura que o suscetível a partir dos 70 DAE, ou seja, próximo à floração, que aconteceu aos 80

DAE, contudo quando crescendo a $700 \mu\text{L L}^{-1}$ os biótipos testados não diferiram quanto a estatura durante seu ciclo (Tabela 42). Em estudo realizado com biótipos suscetível e resistente de *E. crus-galli*, não foi observada diferença na estatura entre os biótipos cultivados na concentração de CO_2 de $380 \mu\text{L L}^{-1}$ (YANG et al.; 2017).

O biótipo suscetível produziu mais afilhos na concentração de 700 quando comparada a $400 \mu\text{L L}^{-1}$; enquanto, as plantas resistentes não diferiram nesta variável nas diferentes $[\text{CO}_2]$. Plantas suscetíveis apresentaram incremento de 11% no número de afilhos quando cresceram na $[\text{CO}_2]$ mais alta (Figura 9). Quando em $400 \mu\text{L L}^{-1}$ biótipos suscetíveis e resistentes não diferiram quanto ao número de afilhos; já, e na concentração de $700 \mu\text{L L}^{-1}$ o biótipo suscetível teve maior produção de afilhos que o resistente, aumento de aproximadamente 14% (Figura 9).

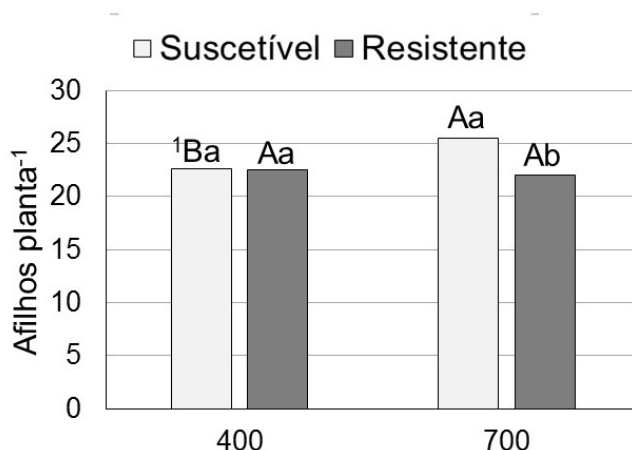


Figura 9 - Número de afilhos em *E. colona* suscetível e resistente a herbicidas cultivados nas concentrações de 400 e $700 \mu\text{L L}^{-1}$ de CO_2 . 1Letras maiúsculas comparam diferentes $[\text{CO}_2]$ no mesmo biótipo, letras minúsculas comparam biótipos suscetível e resistente na mesma $[\text{CO}_2]$ pelo teste de t ($p \leq 0,05$). UARK, Fayetteville/AR/EUA, 2016.

Para as variáveis fotossintéticas verificou-se interação entre os fatores concentração de CO_2 e biótipo para A, EC e EUA (Figura 10); e, efeito isolado do fator concentração de CO_2 para as variáveis g_s , C_i e E (Figura 11). Ambos os biótipos aumentaram A e EUA quando cultivados em $[\text{CO}_2]$ elevada, sendo que biótipo suscetível aumentou cerca de 50% a A e a EUA, enquanto o resistente aumentou 20 e 30% a A e EUA, respectivamente (Figuras 10A e 10B). A EC não foi alterada pela $[\text{CO}_2]$ do ambiente no biótipo suscetível, já o biótipo resistente apresentou redução na EC na concentração de $700 \mu\text{L L}^{-1}$ (Figura 10C).

Devido à anatomia foliar diferencial entre plantas C3 e C4 e à alta concentração de CO_2 nas células da bainha do feixe em plantas C4, autores assumem que a

fotossíntese destas plantas é saturada pela $[CO_2]$ ambiental e que estas não seriam afetadas pelo aumento do CO_2 atmosférico (CHRISTIN et al., 2009; DOUBNEROVA; RYSLAVA, 2011). Em estudo realizado com culturas e plantas daninhas C4 foi observado aumento entre 4 e 30% na fotossíntese líquida dessas (ZISKA; BUNCE, 2007), porém, uma metanálise de diversos experimentos mostrou que as plantas C4 aumentaram cerca 44% sua fotossíntese líquida em condições de elevado CO_2 (GESCH et al., 2003), resultados que corroboram com o encontrado no presente estudo, mostrando que plantas C4 aumentam sua taxa fotossintética em elevada $[CO_2]$.

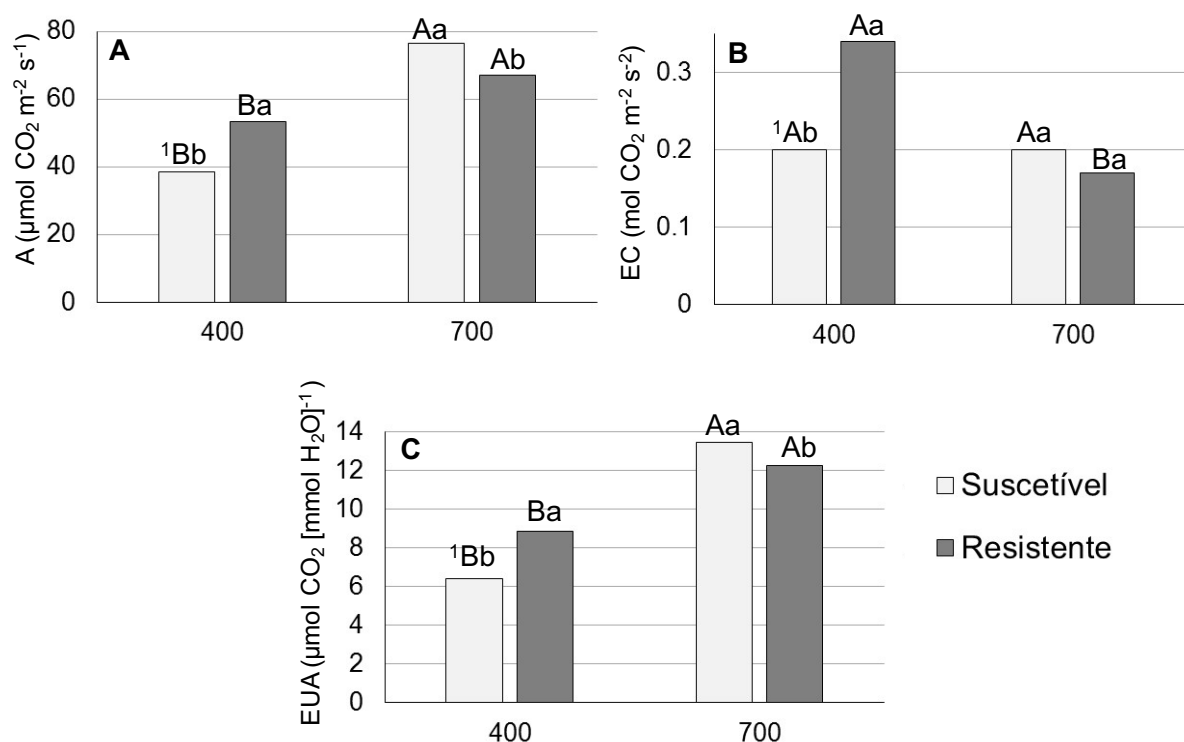


Figura 10 - Número de afilhos em *E. colona* suscetível e resistente a herbicidas cultivados nas concentrações de 400 e 700 $\mu L L^{-1}$ de CO_2 . ¹Letras maiúsculas comparam diferentes $[CO_2]$ no mesmo biótipo, letras minúsculas comparam diferentes $[CO_2]$ para o mesmo biótipo, letras minúsculas comparam biótipos suscetível e resistente na mesma $[CO_2]$ pelo teste de t ($p \leq 0,05$). UARK, Fayetteville/AR/EUA, 2016.

Na concentração de 400 $\mu L L^{-1}$, o biótipo suscetível apresentou A , EC e EUA menor que o biótipo resistente, contudo na concentração de 700 $\mu L L^{-1}$ observou-se comportamento contrário, ou seja, o biótipo suscetível apresentou A e EUA superior ao do biótipo resistente (Figura 10). Ainda, os biótipos não diferiram na variável EC na $[CO_2]$ mais elevada. Estudo reporta que biótipo de *E. crus-galli* com resistência

múltipla a herbicidas apresentou fotossíntese líquida 18% menor que o biótipo suscetível (YANG et al., 2017).

Para as demais variáveis fotossintéticas, verificou-se que em plantas cultivadas a $700 \mu\text{L L}^{-1}$ houve redução em g_s e E e aumento no C_i , quando comparada com plantas que cresceram a $400 \mu\text{L L}^{-1}$, independente de biótipo (Figura 11). Esta redução foi na ordem de de 10 e 8% para o g_s e E , respectivamente. Os resultados do presente estudo foram semelhantes aos observados para cana-de-açúcar quando submetida a diferentes $[\text{CO}_2]$, onde se verificou aumento da taxa fotossintética e de EUA e redução do g_s (DE SOUZA et al., 2008), confirmando, desta forma, que plantas C4 têm suas variáveis fotossintéticas afetadas pelo aumento da $[\text{CO}_2]$ no ambiente.

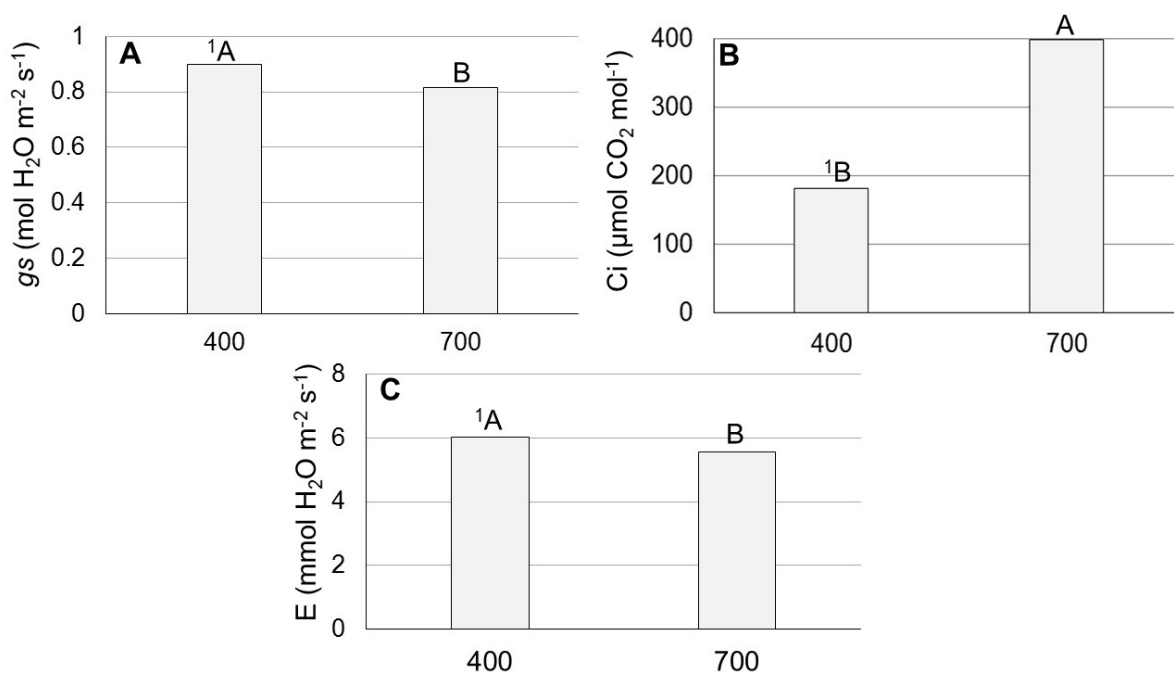


Figura 11 - Condutância estomática (g_s) (A), concentração subestática de CO_2 (C_i) (B) e taxa de transpiração (E) (C) de *E. colona* cultivadas nas concentrações de 400 e $700 \mu\text{L L}^{-1}$ de CO_2 , na média dos biótipos suscetível e resistente a herbicidas. ¹Letras comparam diferentes $[\text{CO}_2]$ pelo teste de t ($p \leq 0,05$). UARK, Fayetteville/AR/EUA, 2016.

Observou-se interação entre os fatores concentração de CO_2 e biótipo para as variáveis AF, números de panículas por plantas e de semente por panícula e produtividade por planta (Figura 12). Houve efeito isolado do fator $[\text{CO}_2]$ para as variáveis MSPA e MSR (Figura 13) e não houve efeito dos fatores testados para a variável massa de mil sementes.

Ambos biótipos apresentaram menor AF e números de panículas por planta quando cresceram na concentração mais baixa de CO₂, sendo que na menor concentração o biótipo suscetível teve redução de 16 e 20%, e o resistente de 12 e 33%, nessas variáveis respectivamente (Figuras 12A e 12B). Quando cresceram na concentração de 400 µL L⁻¹, os biótipos não diferiram quanto à AF, porém na concentração de 700 µL L⁻¹ o biótipo suscetível apresentou maior AF que o resistente. Quanto ao número de panículas, na concentração de 400 µL L⁻¹ as plantas suscetíveis tiveram mais panículas que as resistentes; já, na concentração de 700 µL L⁻¹ não se observou diferença entre os biótipos.

A produção de sementes por panícula para ambos os biótipos não foi afetada pela concentração de CO₂ no ambiente (Figura 12C). Na concentração de 400 µL L⁻¹ não se verificou diferença nessa variável entre os biótipos, contudo na concentração de 700 µL L⁻¹ o biótipo suscetível teve maior número de sementes por panícula que o resistente.

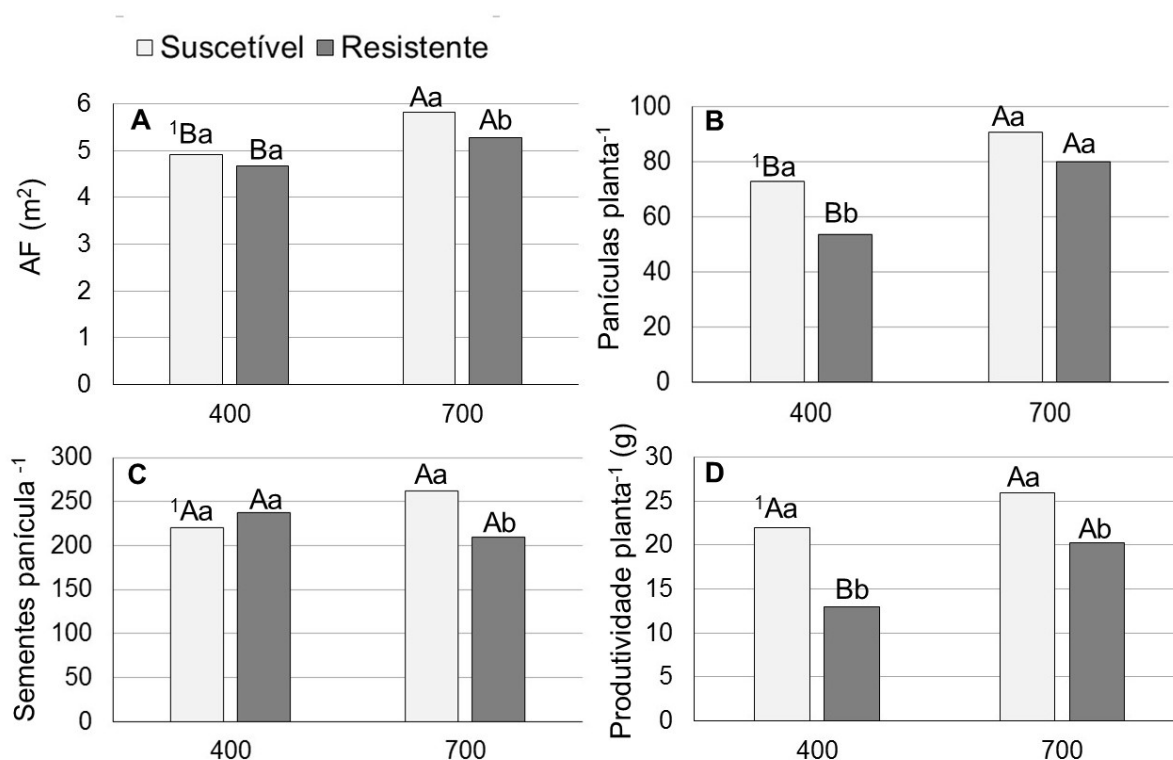


Figura 12 - Área foliar (AF) (A), número de panículas por plantas (B), sementes por panícula (C) e produtividade por planta (D) *E. colona* suscetível e resistente a herbicidas, crescendo nas concentrações de 400 e 700 µL L⁻¹ de CO₂. ¹Letras maiúsculas comparam diferentes [CO₂] no mesmo biótipo, letras minúsculas comparam biótipos suscetível e resistente na mesma [CO₂] pelo teste de t (p≤0,05). UARK, Fayetteville/AR/EUA, 2016.

O biótipo suscetível não teve sua produtividade afetada pela concentração de CO_2 , enquanto o resistente produziu mais sementes quando cresceu na concentração de $700 \mu\text{L L}^{-1}$, sendo esse aumento de cerca de 36% (Figura 12D). O aumento na produtividade das plantas resistentes é resultado do aumento do número de panículas (Figura 12D), contudo o número de afilhos das plantas resistentes não foi afetado quando as plantas foram submetidas à alta $[\text{CO}_2]$ (Figura 12), sendo essas panículas produzidas a mais, provenientes de ramificações secundárias das plantas. Em ambas as $[\text{CO}_2]$ testadas o biótipo suscetível produziu mais semente que o resistente. Plantas C4 aumentam a produção de grãos quando expostas ao aumento da concentração de CO_2 (LONG et al. 2006).

As plantas aumentaram MSPA e MSR quando cultivados na concentração de 700 em relação a $400 \mu\text{L L}^{-1}$, sendo esse incremento de 14% na MSPA e 38% na MSR (Figura 13). Estudo realizado com cana-de-açúcar mostrou 60% de aumento em biomassa quando cultivada em alta $[\text{CO}_2]$ (DE SOUZA et al., 2008); já, plantas de milho aumentaram 20% MSPA e 23% a área foliar quando em $[\text{CO}_2]$ elevadas (MAROCO; EDWARDS; KU, 1999). A resposta positiva observada para MSPA em plantas *E. colona* pode ser atribuída ao aumento da produção de células e alongação celular em plantas cultivada em altas $[\text{CO}_2]$ (PRITCHARD et al., 1999).

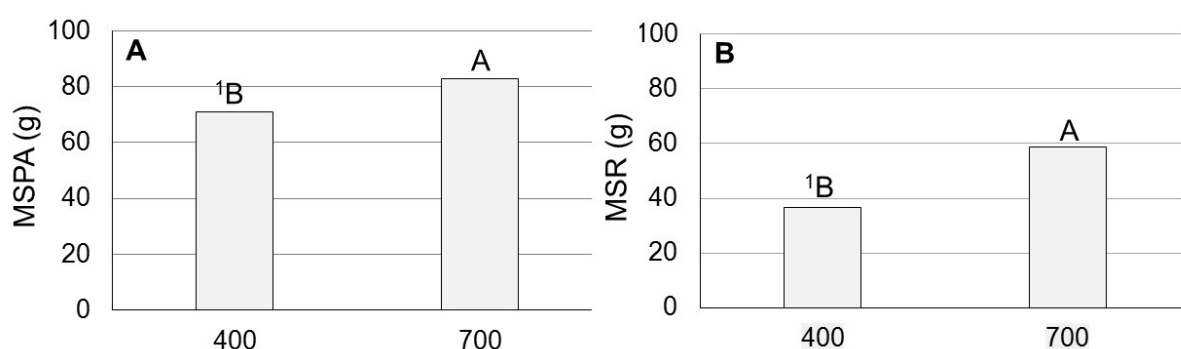


Figura 13 - Massa seca de parte aérea (MSPA) (A) e massa seca de raiz (MSR) (B) de *E. colona* cultivadas nas concentrações de 400 e $700 \mu\text{L L}^{-1}$ de CO_2 na média dos biótipos suscetível e resistente a herbicidas. ¹Letras comparam diferentes $[\text{CO}_2]$ ($p \leq 0,05$). UARK, Fayetteville/AR/EUA, 2016.

Para as variáveis germinação e porcentagem de sementes não viáveis verificou-se interação entre os fatores $[\text{CO}_2]$ e biótipo (Figura 14). Sementes produzidas em plantas suscetíveis cultivadas a $[\text{CO}_2]$ de $700 \mu\text{L L}^{-1}$ apresentaram maior germinação e menor porcentagem de sementes inviáveis, que as produzidas em menor $[\text{CO}_2]$ (Figura 17A). Já, para o biótipo resistente não se observou alteração na qualidade de

suas sementes pela $[CO_2]$ do ambiente. A capacidade das plantas de se reproduzir é parâmetro importante quando se avalia a adaptabilidade dessas, uma vez que biótipos ou genótipos que apresentam vantagens nesse parâmetro terão maior progênie (VILA-AIUB; GUNDEL; PRESTON, 2015). Por isso, é importante avaliar não somente a produção de sementes, mas também sua qualidade, pois essas variáveis efetivamente influenciam a relação entre plantas do biótipo suscetível e resistente no ambiente e no tempo.

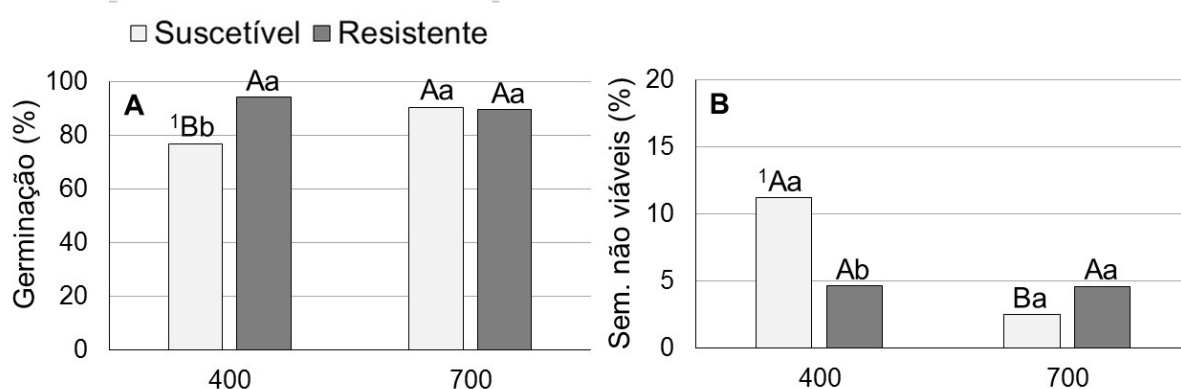


Figura 14 - Germinação de sementes (A) e sementes não viáveis (B) produzidas em plantas de *E. colona* suscetível e resistente a herbicidas cultivado nas concentrações de 400 e 700 $\mu L L^{-1}$ de CO_2 . ¹Letras maiúsculas comparam diferentes $[CO_2]$ no mesmo biótipo, letras minúsculas comparam biótipos suscetível e resistente na mesma $[CO_2]$ pelo teste de t ($p \leq 0,05$). UARK, Fayetteville/AR/EUA, 2016.

Na $[CO_2]$ de 400 $\mu L L^{-1}$, sementes do biótipo resistente tiveram maior germinação e menor porcentagem de sementes inviáveis que o suscetível (Figura 6 B). Na concentração de 700 $\mu L L^{-1}$, os biótipos não diferiram quanto à viabilidade de sementes. Aumento na $[CO_2]$ interfere na qualidade do grão de diversas culturas (MADAN et al., 2012; MYERS et al., 2014). Devido a isso, supõe-se que o CO_2 elevado poderia afetar a germinação de sementes, contudo não são reportados resultados a este respeito. Foi verificado que a $[CO_2]$ na qual as plantas de quatro cultivares de arroz se desenvolvem não interferiu na germinação de sementes produzidas por essas (CHEN et al., 2015).

Adaptabilidade é a resposta fenotípica da planta sendo resultante da sua história evolutiva e significativamente influenciada pela variação genética na população e ambientais (VILA-AIUB; GUNDEL; PRESTON, 2015). Assim, justifica-se a necessidade do uso de biótipos suscetível e resistente oriundos de mesma população em experimentos que avaliem o custo de adaptação. O mecanismo responsável pela resistência múltipla a herbicida no biótipo testado ainda não foi

totalmente elucidado, contudo supõe-se que se trata de mais de um mecanismo de resistência, sendo um deles metabolização e sequestro do herbicida. A identificação dos genes e das bases fisiológicas das resistências herbicidas é importante para a estimativa e interpretação do custo de adaptação nos biótipos (VILA-AIUB; GUNDEL; PRESTON, 2015).

Tanto o biótipo suscetível quanto o resistente, em geral, tiveram aumento da adaptabilidade quando submetidos a maior $[CO_2]$, contudo verificou-se comportamento diferencial entre os biótipos, ou seja, na concentração de $400 \mu L L^{-1}$ o biótipo suscetível apresentou maior número de panículas e produtividade em relação ao resistente, porém o biótipo resistente teve maior A, EC, EUA, estatura e porcentagem de germinação de sementes que o suscetível. Na concentração de $700 \mu L L^{-1}$ o biótipo suscetível apresentou maior A, EC, EUA, número de afilhos, AF, sementes por panículas e produtividade que o resistente, sendo que, nesta concentração, o biótipo resistente não foi superior ao suscetível em nenhuma das variáveis avaliadas. Assim, pode-se inferir que o aumento da $[CO_2]$ reduziu a adaptabilidade do biótipo resistente em relação ao biótipo suscetível.

Em estudo comparando biótipos de *E. colona* suscetível e resistente a propanil, os autores verificaram que os biótipos tinham seu crescimento e morfologia afetados conforme o nível de resistência ao herbicida e, que as plantas resistentes tiveram menor produção de sementes que as suscetíveis (FISHER et al., 1993). Plantas de *E. phyllopogon* com resistência múltipla a herbicidas apresentaram menor estatura, AF, MSPA e produção de sementes que as suscetíveis (BODDY et al., 2012). Trabalho com biótipos de *E. crus-galli* resistentes a propanil ou clomazone não desmontaram haver diferença quanto ao crescimento e competitividade destes (Bagavathiannan et al. 2011), contudo as análises fisiológicas e proteômica demonstraram que a resistência aos herbicidas está associada ao custo de adaptação em biótipos de *E. crus-galli* com resistência múltipla aos herbicidas quincloraque, bispiribaque-sódico e penoxsulam (YANG et al.; 2017). Estes resultados demonstram o quanto é variável a influência da resistência no custo de adaptação das plantas dentro do mesmo gênero, pois o custo de adaptação está diretamente ligado ao mecanismo de resistência e ao ambiente em que as plantas crescem e se desenvolvem. Mecanismos bioquímicos envolvidos na resistência múltipla de certos biótipos estão relacionados à tolerância das plantas a diversos estresses ambientais, o que pode conferir vantagem aos biótipos resistentes em certos ambientes (YASOUR et al., 2011). Desta forma, é

necessário ampliar os estudos sobre as respostas dos biótipos em diferentes cenários ambientais, para que se possa prever a evolução da resistência frente as mudanças climáticas.

Na análise do segundo experimento, que avaliou a expressão de genes de enzimas ligadas a fotossíntese, estresse antioxidativo e metabolização de herbicidas, observou-se que para a expressão dos genes *EcRbcS1*, *EcGST1*, *EcSODcu/zn*, *CYP81A12* e *EIF4B* ocorreu interação entre os fatores $[CO_2]$ e biótipo (Figura 15). Quando submetidos ao aumento da $[CO_2]$, o biótipo suscetível aumentou o número de genes transcritos de *EcRbcS1* e *EcGST1*, sendo esse aumento de cerca de 1,6 e 2 vezes, respectivamente; porém, não se observou diferença na expressão do gene *EcSODcu/zn*. Para o biótipo resistente, observou-se redução nos genes transcritos de *EcRBCS1*; *EcSODcu/zn* e *EcGST1*, quando o biótipo cresceu na concentração mais elevada de CO_2 , sendo que esses genes foram menos expressos em 1,2; 2,7 e 2,5 vezes, respectivamente.

Na concentração de $400 \mu L L^{-1}$, a expressão dos genes *EcRBCS1*; *EcSODcu/zn* e *EcGST1* foi maior no biótipo resistente que no suscetível, cerca de 2, 4 e 3 vezes, respectivamente (Figuras 15A, 15B e 15C). Na concentração de $700 \mu L L^{-1}$, o biótipo suscetível teve maior expressão dos genes *EcRbcS1* e *EcGST*, comparativamente ao biótipo resistente (Figuras 15A e 15C), enquanto para o gene *EcSODcu/zn* não foi verificada diferença na expressão entre os biótipos nessa $[CO_2]$.

A enzima 1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase (Rubisco) tem papel chave na fotossíntese, sendo que em plantas superiores é formada de oito subunidades pequenas (*small subunits*), que são denominadas *RbcS* e oito subunidades grandes (*large subunits*) denominadas *RbcL* (SUZUKI et al., 2009). No presente trabalho, optou-se por estudar a expressão do gene que codifica a subunidade *RbcS1*, por essa ser responsiva a mudanças na $[CO_2]$ em plantas de arroz (GESCH et al., 1998).

O comportamento observado para a expressão do gene *EcRbcS1* foi o mesmo verificado para a fotossíntese líquidas dos biótipos em estudo (Figura 10A), o que indica que as mudanças na fotossíntese possivelmente estão ligadas ao aumento ou redução da expressão desse gene. A regulação negativa da expressão de genes das famílias *RBCS* e *RBCL* em plantas cultivadas em alta $[CO_2]$, como o observado em plantas do biótipo resistente (Figura 15A), já foi documentada anteriormente, embora o mecanismo que regula essa expressão não esteja completamente elucidado (CHENG; MOORE; SEEMANN, 1998; GESCH et al., 1998). O aumento da expressão

do gene *EcRBCS1* nas plantas suscetíveis quando cultivadas em alta $[CO_2]$ ainda deve ser melhor estudado para que se possa afirmar que o aumento nos transcritos resulta efetivamente em mais unidades da enzima Rubisco.

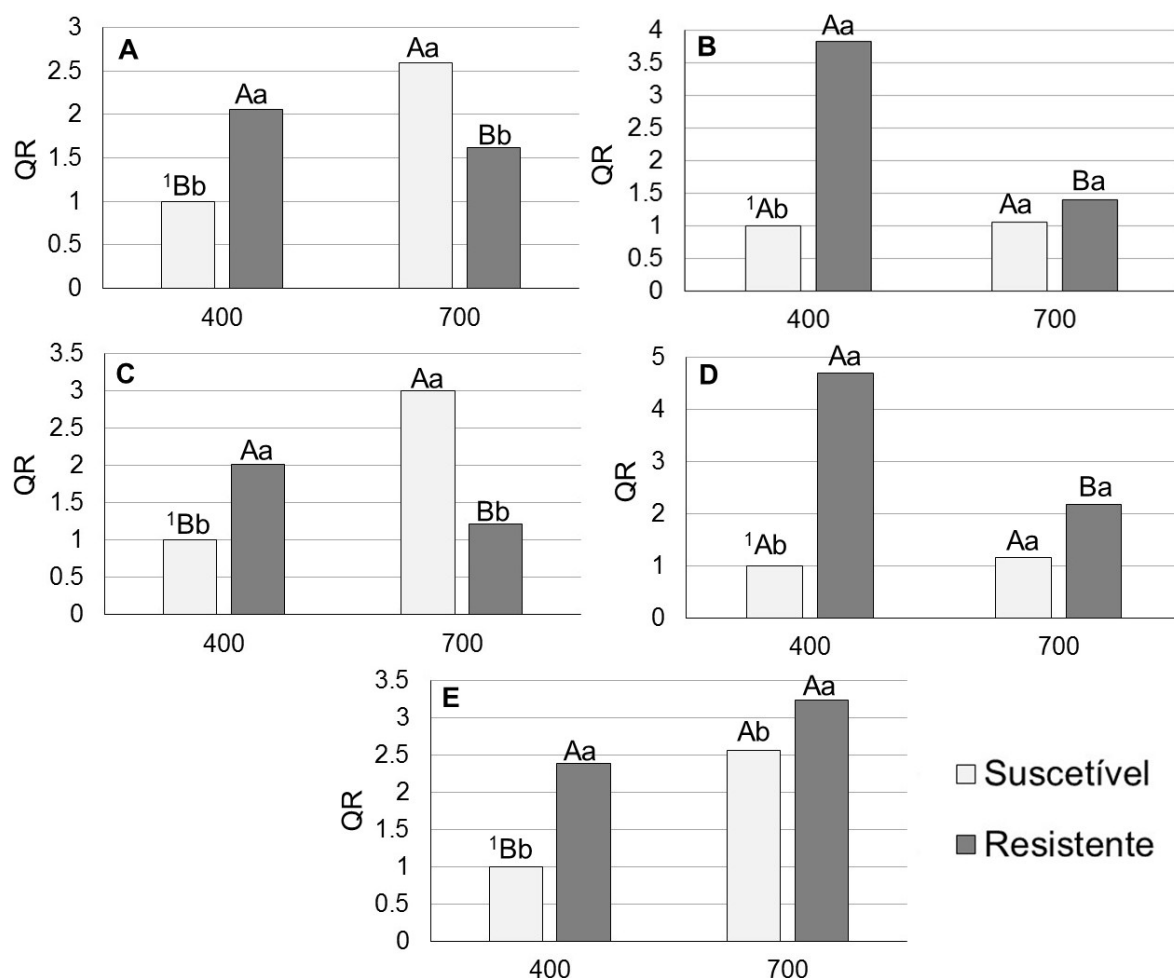


Figura 15 - Quantificação relativa (QR) do perfil de expressão dos genes *EcRbcS1*(A), *EcSODcu/zr* (B), *EcGST1* (C), *CYP81A12* (D) e *Elf-4b* (E) em *E. colona* suscetível e resistente a herbicidas crescendo nas concentrações de 400 e 700 $\mu L L^{-1}$ de CO_2 . 1Letras maiúsculas comparam diferentes $[CO_2]$ no o mesmo biótipo, letras minúsculas comparam biótipos suscetível e resistente na mesma $[CO_2]$ pelo teste de t ($p \leq 0,05$). UARK, Fayetteville/AR/EUA, 2016.

A enzima superóxido dismutase é uma metaloenzima, presente em diversos compartimentos celulares e muito eficiente na degradação de espécies reativas de oxigênio (EROs). Esta enzima catalisa a dismutação de superóxido ($O_2^{\cdot -}$) em oxigênio (O_2) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), sendo o H_2O_2 degradado por outras enzimas antioxidantes como a catalase e a ascorbato peroxidase (NOCTOR; LELARGE-TROUVERIE; MHAMDI, 2015), sendo por isso a SOD considerada como a primeira linha de defesa das plantas contra o efeito tóxico dos EROs.

Os processos metabólicos dependentes de oxigênio, como a respiração aeróbica, fotossíntese e fotorrespiração, levam à produção de EROs (NECTOR; MHAMDI; FOYER, 2016). A redução da expressão do gene *EcSOD cu/zn* em plantas cultivadas em maior [CO₂] pode ser atribuída, ao fato de que nesta concentração as plantas reduzem a fotorrespiração, o que reduz a produção de EROs e, consequentemente o estresse oxidativo e a resposta antioxidante. Estudo realizado com plantas de café demonstrou redução da atividade de enzimas antioxidantes e a redução na expressão do gene *SOD cu/zn* em plantas cultivadas em alta [CO₂] (MARTIN et al., 2016).

A glutathione S-transferase (GST) constitui-se de uma família de enzimas responsáveis pela fase II da metabolização de herbicidas em plantas. Nesta fase ocorre a conjugação da molécula do herbicida com glutathione, após ser ativada na fase I (YUAN; TRANEL; NEAL, 2007). Quando cultivado a 400 $\mu\text{L L}^{-1}$, o biótipo resistente expressou 3 vezes mais o gene *EcGST1* em comparação ao biótipo suscetível, resultado que vai ao encontro ao encontrado em estudo anterior que mostrou que tanto plântulas quanto plantas adultas de *E. crus-galli* resistentes a quinclorac expressaram de 1,5 - 3 vezes mais *EcGST1* que as plantas suscetíveis, quando estas não foram submetidas à aplicação de herbicida (LI et al., 2013a). Em *Alopercurus myosuroides* e *Lolium rigidum* o aumento da expressão do gene *GSTF1* está relacionado à tolerância aos herbicidas chlorotoluron e fenoxaprope-p-etílico, causando resistência múltipla (CUMMINS et al., 2013).

Para expressão do gene *CYP81A12* no biótipo suscetível não houve diferença entre as [CO₂]; já, o biótipo resistente reduziu o número de transcritos desse gene quando cultivado na maior [CO₂], sendo o gene *CYP81A12* expresso 2,5 vezes menos em plantas resistentes cultivadas na maior [CO₂], que na menor [CO₂] (Figura 15D). Em 400 $\mu\text{L L}^{-1}$, o biótipo resistente expressou mais o gene *CYP81A12* que o suscetível, cerca de 4,7 vezes. Por outro lado, na concentração de 700 $\mu\text{L L}^{-1}$ não se observou diferença entre os biótipos.

O incremento da detoxificação de herbicidas por enzimas citocromo P450 monooxigenase está envolvido no processo de resistência de biótipos de *Echinochloa*, tanto no Brasil quanto nos EUA (MATZENBACHER et al., 2015; RIAR et al., 2012). Em *E. phyllopogon*, o gene *CYP81A12*, juntamente com o *CYP81A21*, está envolvido na resistência a dois herbicidas inibidores da enzima ACCase, sendo esse gene expresso quatro vezes mais no biótipo resistente comparativamente ao biótipo

suscetível, dependendo do tecido analisado, (IWAKAMI et al., 2014), resultados que corroboram com o encontrado no presente estudo quando as plantas cresceram na menor [CO₂].

A expressão do fator de transcrição *Elf-4b*, para ambos os biótipos, foi maior na [CO₂] mais elevada, sendo aproximadamente 2,6 e 1,4 vezes para os biótipos suscetível e resistente, respectivamente (figura 15E). O biótipo resistente expressou mais o gene *Elf-4b* que o suscetível em ambas as [CO₂] testadas, observando-se nas plantas resistentes 2,4 e 1,3 vezes mais transcritos do gene *Elf-4b* que nas suscetíveis, para as [CO₂] de 400 e 700 µL L⁻¹, respectivamente.

O fator de iniciação de tradução *Elf-4b* é responsável pelo processo de reconhecimento do mRNA pelos ribossomos durante a síntese proteica (SPRIGGS; BUSHELL; WILLIS, 2010). A proteína codificada pelo gene *Elf-4b* apresenta função helicase, responsável pelo desenrolamento de alguns mRNA na região 5'URT e exposição do códon inicial (AUG) para o início da tradução (SHAHBAZIAN et al., 2010). A expressão desse gene está relacionada com a resposta das plantas a certos estresses, sendo este importante na regulação gênica pós-transcricional de eucariotos (SONENBERG; HINNEBUSCH, 2009). Desta forma, pode-se correlacionar o aumento no número de transcritos do gene *Elf-4b* com o incremento da expressão de diversos genes, principalmente quando as plantas estão expostas a mudanças no ambiente em que se desenvolvem. O aumento da expressão do gene *Elf-4b* no presente estudo provavelmente decorre da adaptação da planta ao elevado CO₂, podendo desencadear diversos processos fisiológicos que ainda precisam ser melhor estudados.

O biótipo suscetível de *E. colona* aumento na expressão do gene *EcGST1* quando as plantas suscetíveis cresceram em alta [CO₂]. Desta forma, é importante a condução de estudos que verifiquem se o aumento na expressão desse gene resulta em aumento da tolerância do biótipo a herbicidas, uma vez que estudo aponta que o aumento da [CO₂] favorece a tolerância de plantas a herbicidas (MANEA et al., 2011). Outro ponto que merece investigações posteriores é a regulação diferencial dos genes dos biótipos resistente e suscetível quando expostos ao aumento do CO₂, buscando identificar as causas e as consequências dessas diferentes respostas gênicas e os impactos na adaptação dos biótipos e também em sua tolerância a herbicidas em novos ambientes.

5.4 Conclusões

Futuros aumento na concentração atmosférica de CO₂ beneficia os biótipos de *E. colona*, incrementando variáveis fisiológicas, morfológicas e reprodutivas.

Na concentração atual de CO₂ (400 µL L⁻¹) o biótipo resistente, em geral, não apresenta desvantagem adaptativas em relação ao suscetível, mas na concentração projetada para o fim do século (700 µL L⁻¹) esse é menos produtivo que o suscetível.

Os biótipos de *E. colona* suscetível e com resistência múltipla aos herbicidas quincloraque, propanil, cialofope-butílico e glufosinato de amônio apresentam regulação diferencial da expressão dos genes *EcRbcS1*, *EcGST1*, *EcSODcu/zn*, *CYP81A12* e *EIF4B* quando expostas as concentrações de CO₂ de 400 e 700 µL L⁻¹.

6 CONCLUSÕES

Arroz e arroz-vermelho apresentam respostas fisiológicas e moleculares semelhantes quando expostos a déficit hídrico e temperaturas supra ótimas, sendo observado nessas condições de estresse redução na fotossíntese, elevação de danos à biomoléculas e aumento na expressão de genes ligados a proteção à estresses abióticos, em ambas as plantas.

Quanto a qualidade de luz, o arroz tem variáveis fisiológicas e de crescimento afetadas positivamente pela luz azul, já a luz vermelha aumenta penas variáveis de crescimento. O arroz-vermelho apresenta, incremento nas variáveis de crescimento somente quando exposto a luz azul.

Em um cenário de mudanças climáticas com déficit hídrico, temperatura supra ótimas e diferentes qualidades de luz e elevado [CO₂] atmosférico o capim-arroz, por ser C₄, é ainda mais competitivo com a cultura do arroz, pois ao contrário das plantas C₃, praticamente não apresenta mudanças fisiológicas e moleculares e aumenta o crescimento e produtividade em atmosferas com alta [CO₂]. Contudo, biótipos de capim-arroz com resistência múltipla a herbicidas, apresentam desvantagens adaptativas em ambientes alta [CO₂], em comparação ao biótipo suscetível.

O uso de dois genes normalizadores é suficiente para análise quantitativa de RT-qPCR em arroz, arroz-vermelho e capim-arroz expostos a déficit hídrico e temperatura supra ótima, sendo os genes *OsUBC-E2* e *OsUBQ10* mais estáveis para déficit hídrico; e *Osβ-Tubulina* e *OsUBC-E2* para temperatura.

7 REFERÊNCIAS

ADACHI, S.; NAKAE, T.; UCHIDA, M.; SODA, K.; TAKAI, T.; OI, T.; YAMAMOTO, T.; OOKAWA, T.; MIYAKE, H.; YANO, M.; HIRASAWA, T. The mesophyll anatomy enhancing CO₂ diffusion is a key trait for improving rice photosynthesis. **Journal of Experimental Botany**, v.64, p.1061-1072, 2013.

AGOSTINETTO, D.; GALON, L.; SILVA, J.M.B.V.; TIRONI, S.P.; ANDRES, A. Interferência e nível de dano econômico de capim-arroz sobre o arroz em função do arranjo de plantas da cultura. **Planta Daninha**, v.28, p. 993-1003, 2010.

AGRAWAL, G.K.; JWA, N.S.; IWAHASHI, H.; RAKWAL, R. Importance of ascorbate peroxidase OsAPX1 and OsAPX2 in the rice pathogen response pathways and growth and reproduction revealed by their transcriptional profiling. **Gene**, v.322, p.93–103, 2003.

AHUJA, I.; VOS, R.C.H.; BONES, A.M.; HALL, R.D. Plant molecular stress responses face climate change. **Trends in Plant Science**, v.15, p.664–674, 2010.

AKRAM, H.M.; ALI, A.; SATTAR, A.; REHMAN, H.S.U.; BIBI, A. Impact of water deficit stress on various physiological and agronomic traits of three Basmati rice (*Oryza sativa* L.) cultivars. **The Journal of Animal & Plant Sciences**. v.23, p.1415-1423, 2013.

ALARCON-REVERTE, R.; GARCIA, A.; WATSON, S.B.; ABDALLAH, I.; SABATE, S.; HERNANDEZ, M.J.; DAYAN, F.J.; FISCHER, A.J. Concerted action of target-site mutations and high EPSPS activity in glyphosate-resistant junglerice (*Echinochloa colona*) from California. **Pest Management Science**, v.71, p.996-1007, 2014.

ALFONSO, S.U.; BRUGGEMANN, W. Photosynthetic responses of a C3 and three C4 species of the genus *Panicum* (s.l.) with different metabolic subtypes to drought stress **Photosynthesis Research**, v.112, p.175-191, 2012.

AMANO, M.; IIDA, S.; KOSUGE, K. Comparative studies of thermotolerance: different modes of heat acclimation between tolerant and intolerant aquatic plants of the genus *Potamogeton*. **Annals of Botany**, v.109, p.443–452, 2012.

AMRI, E.; SHAHSAVAR, A. Response of lime seedlings (*Citrus aurantifolia* L.) to exogenous spermidine treatments under drought stress. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, v.4, p.4483–4489, 2010.

ANDERSEN, C.L.; JENSEN, J.L.; ORNTOFT, T.F.; Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. **Cancer Research**, v.64, p.5245–5250, 2004.

ANDRES, A.; CONCENÇO, G.; MELO, P.T.B.S.; SCHMIDT, M.; RESENDE, R.G. Detecção da resistência de capim-arroz (*Echinochloa* sp.) ao herbicida quinclorac em regiões orizícolas do sul do Brasil. **Planta Daninha**, v. 25, p. 221-226, 2007.

ANDRES, A.; MACHADO, S. L. O. Plantas daninhas em arroz irrigado. In: GOMES, A. S.; MAGALHÃES Jr., A. M. (Eds.). **Arroz irrigado no sul do Brasil**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2004. p. 457-546.

ARNON, D.I. Copper enzymes in isolated chloroplasts, polyphenoxidase in beta vulgaris. **Plant physiology**, v.24, p.1-15, 1949.

ASHRAF, M.; HARRIS, P. Photosynthesis under stressful environments: An overview. **Photosynthetica**, v.51, p.163-190, 2013.

AZEVEDO, R.A.; ALAS, R.M.; SMITH, R.J.; LEA, P.J. Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in the leaves and roots of wild-type and a catalase-deficient mutant of barley. **Physiologia Plantarum**, v.104, p.280-292, 1998.

BAGAVATHIANNAN, M.V.; NORSWORTHY, J.K.; JHA, P.; SMITH, K. Does resistance to propanil or clomazone alter the growth and competitive abilities of barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*)? **Weed Science**, v.59, p.353–358, 2011.

BAJWA, A.; JABRAN, K.; SHAHID, M. ALI, H.H.; CHAUHAN, B.S.; EHSANULLAH. Eco-biology and management of *Echinochloa crus-galli*. **Crop Protection**, v.75, p.151-162, 2015.

BALLA, K.; BENCZE, S.; JANDA, T.; VEISZ, O. Analysis of heat tolerance in winter wheat. **Acta Agronomica Hungarica**, v.57, p.437–444, 2009.

BARNABAS, B.; JAGER, K.; FEHER, A. The effect of drought and heat stress on reproductive processes in cereals. **Plant, Cell and Environment**, v.31, p.11–38, 2008.

BARTOLI, C.G.; GOMEZ, F.; MARTINEZ, D.E.; GUIAMET J.J. Mitochondria are the main target for oxidative damage in leaves of wheat (*Triticum aestivum* L.). **Journal of Experimental Botany**, v.55, p.1663–1669, 2004.

BATES, L.S.; WALDREN, R.P.; TEARE, I.D. Rapid determination of free proline for water-stress studies. **Plant and Soil**, v.39, p.205-207, 1973.

BECKLIN, K.M.; ANDERSON, J.T.; GERHART, L.M.; WADGYMAR, S.M.; WESSINGER, C.A.; WARD, J.K. Examining plant physiological response to climate change through an evolutionary lens. **Plant Physiology**, v.172, p.793-802, 2016.

BERGSTRAND, K.J.; ASP, H.; SCHÜSSLER, H.K. Development and acclimatization of horticultural plants subjected to narrow-band lighting. **European Journal of Horticultural Science**, v.72, p.45-51, 2014.

BERGSTRAND, K.J.; MORTENSEN, L.M.; SUTHAPARAN, A.; GISLEROD, H.R. Acclimatisation of greenhouse crop to differing light quality. **Scientia Horticulturae**, v.204, p.1-7, 2016.

BHATTACHARJEE, S. Sites of generation and physicochemical basis of formation of reactive oxygen species in plant cell. In: GUPTA, S.D. **Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants**. Enfield: Science Publishers, 2010. p.1-30.

BITA, C.; GERATS, T. Plants tolerance to high temperature in a changing environment: scientific fundamentals and production of heat stress-tolerant crop. **Frontiers in Plant Science**, v.4, p.273, 2013.

BITA, C.E.; ZENONI, S.; VRIEZEN, W.H.; MARIANI, C.; PEZZOTTI, M.; GERATS, T. Temperature stress differentially modulates transcription in meiotic anthers of heat-tolerant and heat-sensitive tomato plants. **BMC Genomics**, v.12, p.384, 2011.

BLOKHINA, O.; VIROLAINEN, E.; FAGERSTEDT, K. V. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. **Annals of Botany**, v.91, p.179-194. 2003.

BODDY, L.G.; STREIBIG, J.C.; YAMASUE, Y.; FISCHE A.J. Biomass, fecundity, and interference ability of multiple herbicide-resistant and -susceptible late watergrass (*Echinochloa phyllopogon*). **Weed Science**, v.60, p.401-410, 2012.

BOWES, G. Facing the inevitable: Plants and increasing atmospheric CO₂. **Plant Molecular Biology**, v.44, p.309–332, 1993.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.7, p.248-254, 1976.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília: MAPA/ACS, 2009. 395p.

BURGOS, N.R.; NORMAN, R.J.; GEALY, D.R.; BLACK, H. Competitive N uptake between rice and weedy rice. **Field Crops Research**, v.99, p.96-105, 2006.

BUSI, R.; VILA-AIUB, M.M.; POWLES, S.B. Genetic control of a cytochrome P450 metabolism-based herbicide resistance mechanism in *Lolium rigidum*. **Heredity**, v.106, p. 817-824, 2011.

BUSTIN, S.A.; BENES, V.; GARSON, J.A.; HELLEMANS, J.; HUGGETT, J.; KUBISTA, M.; MUELLER, R.; NOLAN, T.; PFAFFL, M.W.; SHIPLEY, G.L.; VANDESOMPELE, J.; WITTWE, C.T. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clinical Chemistry**, v.55, 611–622, 2009.

CABUSLAY, G.S.; ITO, O.; ALEJAL, A.A. Physiological evaluation of responses of rice (*Oryza sativa* L.) to water deficit. **Plant Science**, v.163, p.815–827, 2002.

CAMEJO, D.; RODRÍGUEZ, P.; MORALES, A.M.; DELL'AMICO, J.M.; TORRECILLAS, A. High temperature effects on photosynthetic activity of two tomato cultivars with different heat susceptibility. **Journal of Plant Physiology**, v.162, p.281–289, 2005.

CAO, Y.Y.; ZHAO, H. Protective roles of brassinolide on rice seedlings under high temperature stress. **Rice Science**, v.15, p.63–68, 2008.

CATTIVELLI, L.; RIZZA, F.; BADECK, F.W.; MAZZUCOTELLI, E.; MASTRANGELO, A.M.; FRANCIA, E.; MARÈA, C.; TONDELLIA, A.; STANCA, M. Drought tolerance improvement in crop plants: an integrated view from breeding to genomics. **Field Crops Research**, v.105, p.1–14, 2008.

CAVERZAN, A.; BONIFACIO, A.; CARVALHO, F.E.L.; ANDRADE, C.M.B.; PASSAIA, G.; SCHÜNEMANN, M.; MARASCHIN, F.S.; MARTINS, M.O.; TEIXEIRA, F.K.; RAUBER, R.; MARGIS, R.; SILVEIRA, J.A.G.; MARGIS-PINHEIRO, M. The knockdown of chloroplastic ascorbate peroxidase reveals its regulatory role in the photosynthesis and protection under photo-oxidative stress in rice. **Plant Science**, v.214, p.74–87, 2014.

CENTRITTO, M.; LAUTERI, M.; MONTEVERDI, M.C.; SERRAJ, R. Leaf gas exchange, carbon isotope discrimination, and grain yield in contrasting rice genotypes subjected to water deficits during the reproductive stage. **Journal of Experimental Botany**, v.60, p.2325–2339, 2009.

CHALLINOR, A.; WHEELER, T.; CRAUFURD, P.; FERRO, C.; STEPHENSON, D. Adaptation of crops to climate change through genotypic responses to mean and extreme temperatures. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v.119, p.190–204, 2007.

CHANDER, S.; DARYAEL, M.G.; AGGARWA, P.K. Assessment of crop losses due to insect pests and weeds in rice (*Oryza sativa*). **The Indian Journal of Agricultural Sciences**, v.78, p.333–336, 2008.

CHAUDIÈRE, J.; FERRARI-ILIOU, R. Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms. **Food and Chemical Toxicology**, v.37, p.949–962, 1999.

CHAUHAN, B.S.; JOHNSON, D.E. Growth and reproduction of junglerice (*Echinochloa colona*) in response to water stress. **Weed Science**, v.58, p.132–135, 2010.

CHA-UM, S. Water deficit stress in the reproductive stage of four indica rice (*Oryza sativa* L.) genotypes. **Pakistan Journal of Botany**, v.42, p.3387–3398, 2010.

CHA-UM, S.; YOOYONGWECH, S.; SUPAIBULWATANA, K. Water deficit stress in the reproductive stage of four indica rice (*Oryza sativa* L.) genotypes. **Pakistan Journal of Botany**, v.42, p.3387–3398, 2010.

CHAVES, M.M.; FLEXAS, J.; PINHEIRO, C. Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. **Annals of Botany**, v.103, p.551–560, 2009.

CHAVES, M.M.; MAROCO, J.P.; PEREIRA, J.S. Understanding plant responses to drought - From genes to the whole plant. **Functional. Plant Biology**, v.30, p.239–264, 2009.

CHEN, C.; JIANG, Q.; ZISKA, L.H.; ZHU, J.; LIU, G.; ZHANG, J.; NI, K.; SENEWEERA, S.; ZHU, C. Seed vigor of contrasting rice cultivars in response to elevated carbon dioxide. **Field Crops Research**, v.178, p.63–68, 2015.

CHEN, C.T.; CHEN, L.M.; LIN, C.C.; KAO, C.H. Regulation of proline accumulation in detached rice leaves exposed to excess copper. **Plant Science**, v.160, p.283–290, 2001.

CHEN, I.C.; HILL, J.K.; OHLEMULLER, R.; ROY, D.B.; THOMAS, C. Rapid range shifts of species associated with high levels of climate warming. **Science**, v.333, p.1024–1026, 2011.

CHENG, S.H.; MOORE, B.; SEEMANN, J.R. Effects of short- and long-term elevated CO_2 on the expression of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase genes and carbohydrate accumulation in leaves of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. **Plant Physiology**, v.116, p.715–723, 1998.

CHRISTIE, J.M. Phototropin blue-light receptors. **Annual Review of Plant Biology**, v.58, p.21–45, 2007.

CHRISTIN, P.A.; SAMARITANI, E.; PETITPIERRE, B.; SALAMIN, N.; BESNARD, G. Evolutionary insights on C4 photosynthetic subtypes in grasses from genomics and phylogenetics. **Molecular Biology and Evolution**, v.1, p.221–230, 2009.

CLAY, S.A.; KLEINJAN, J.; CLAY, D.E.; FORCELLA, F.; BATCHELOR, W. Growth and fecundity of several weed species in corn and soybean. **Agronomy Journal**, v.97, p.294–302, 2005.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB. Acompanhamento da safra brasileira – Grãos. Safra 2013/2014. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/15_11_16_15_18_26_safras_nov_2015.pdf>. Acessado em: 10 abr. 2017.

CUMMINS, I.; DIXON, D.P.; FREITAG-POHL, S.; SKIPSEY, M.; EDWARDS, R. Multiple roles for plant glutathione transferases in xenobiotic detoxification. **Drug Metabolism Reviews**, v.43, p.266-280, 2011.

CUMMINS, I.; WORTLEY, D.J.; SABBADIN, F.; HE, Z.; COXON, C.R.; STRAKER, H.E.; SELLARS, J.D.; KNIGHT, K.; EDWARDS, L.; HUGHES, D.; KAUNDUN, S.S.; HUTCHINGS, S.J.; STEEL, P.G.; EDWARDS, R. Key role for a glutathione transferase in multiple-herbicide resistance in grass weeds. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v.110, p.5812–5817, 2013.

CZECHOWSKI, T.; STITT, M.; ALTMANN, T.; UDVARDI, M.K.; SCHEIBLE, W.R. Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in *Arabidopsis*, **Plant Physiology**, v.139, p.5–17, 2005.

DALAZEN, G.; MARKUS, C.; MENEGAZ, C.; RAFAELI, R.S.; MEROTO Jr., A. Genes relacionados à detoxificação de imazethapyr em capim-arroz (*Echinochloa crus-galli*). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ARROZ IRRIGADO, n.9, 2015, Pelotas. **Anais...** Pelotas: SOSBAI, 2015. p. 840-843.

DAMANIK, R.I.; ISMAIL, M.R.; SHAMSUDDIN, Z.; OTHMAN, S.; ZAIN, A.M.; MAZIAH, M. Response of antioxidant systems in oxygen deprived suspension cultures of rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Growth Regulation*, v. 67, p. 83-92, 2012.

DARMENCY, H.; PERNES, J. Agronomic performance of triazine resistant foxtail millet (*Setaria italica* (L.) Beauv.). **Weed Research**, v.29, p.147–150, 1989.

DASH, S.; MOHANTY, N. Response of seedlings to heat-stress in cultivars of wheat: growth temperature-dependent differential modulation of photosystem 1 and 2 activity and foliar antioxidant defense capacity. **Journal of Plant Physiology**, v.159, p.49-59, 2002.

DAVISON, P.A.; HUNTER, C.N.; HORTON, P. Overexpression of β -carotene hydroxylase enhances stress tolerance in *Arabidopsis*. **Nature**, v.418, p.203-206, 2002.

DE SOUZA, A.P.; GASPAR, M.; DA SILVA, E.A.; ULIAN, E.C.; WACLAWOVSKY, A.J.; NISHIYAMA, M.Y.; DOS SANTOS, R.V.; TEXEIRA, M.M.; SOUZA, G.M.; BUCKERIDGE, M.S. Elevated CO₂ increases photosynthesis, biomass and productivity, and modifies gene expression in sugarcane. **Plant, Cell and Environment**, v.31, p.1116-1127, 2008.

DEDONDER, A.; RETHY, R.; FREDERICQ, H.; VAN MONTAGU, M.; KREBBERS, E. *Arabidopsis* rbcS genes are differentially regulated by light. **Plant Physiology**, v.101, p.801–808, 1993.

DEL LONGO, O.T.; GONZÁLEZ, C.A.; PATORI, G.M.; TRIPPI, V.S. Antioxidant defenses under hyperoxygenic and hyperosmotic conditions in leaves of two lines of maize with differential sensitivity to drought. **Plant and Cell Physiology**, v. 34, p. 1023-1028, 1993.

DERVEAUX, S.; VANDERSOMPELE, J.; HELLEMANS, J. How to do successful gene expression analysis using real-time PCR. **Methods**, v.50, p.227–230, 2010.

DIXON, D. P.; LAPTHORN, A.; EDWARDS, R. Plant glutathione transferases. **Genome Biology**, v.3, p.1-10, 2002.

DOUBNEROVA, H.; RYSLAVA, H. What can enzymes C4 photosynthesis do for C3 plants under stress? **Plant Science**, v.180, p.575-583, 2011.

DUAN Y.H.; GUO, J.; DING, K.; WANG, S.J.; ZHANG, H.; DAI, X.W.; GOVERS, F.; HUANG, L.L.; KANG, Z.S. Characterization of a wheat *HSP70* gene and its expression in response to stripe rust infection and abiotic stresses. **Molecular Biology Reports**, v.38, p.301–307, 2010.

DUBEY, R.S. Metal toxicity, oxidative stress and antioxidative defense system in plants. In: GUPTA, S.D. **Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants**. Enfield: Science Publishers, 2011. Chap.9, p.178-203.

EDWARDS, R; Dixon, D.P.; CUMMINS, I.; BRAZIER-HICKS, M.; SKIPSEY, M. New perspectives on the metabolism and detoxification of synthetic compounds in plants. In: SCHRÖDER, P.; COLLINS, C. D. (Ed.). **Organic xenobiotics and plants: from mode of action to ecophysiology**. New York: Springer, 2011, p.25-148.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. 3.ed. Brasília, 2013. 353p.

ESTORNINOS JR., L.E.; GEALY, D.R.; GBUR, E.E.; TALBERT, R.E.; C.; CHANDLER, J.M.; PARK, W.D. Is all red rice found in commercial rice really (*Oryza sativa*) ecotypes. **Weed Science**, v.53, p.683-689, 2005.

FAHEED, F. Comparative effects of four herbicides on physiological aspects in *Triticum sativum* L. **African Journal of Ecology**, v.50, p.29-42, 2012.

FAHRAMAND, M.; MAHMOODY, M.; KEYKHA, A.; NOORI, M.; RIGI, K. Influence of abiotic stress on proline, photosynthetic enzymes and growth. *International Research Journal of Applied and Basic Science*, v.8, p.257-265, 2014.

FAIZE M.; BURGOS, L.; FAIZE, L. PIQUERAS, A.; NICOLAS, E.; BARBA-ESPIN, G.; CLEMENTE-MORENO, M.J.; ALCOBENDAS, R.; ARTLIP, T.; HERNANDEZ, J.A. Involvement of cytosolic ascorbate peroxidase and Cu/Zn- superoxide dismutase for improved tolerance against drought stress. **Journal of Experimental Botany**, v.62, p.2599–2613, 2011.

FAO- Food and agriculture organization of the united nations. Production and trade statistics. Disponível em:< <http://www.fao.org/economic/ess/ess-trade/en/>>. Acessado em: 15 jan. 2017.

FAROOQ, M.; WAHID, A.; KOBAYASHI, N.; FUJITA, D.; BASRA, S.M.A. Plant drought stress: effects, mechanisms and management. **Agronomy for Sustainable Development**, v.29, p.185-212, 2009.

FELLER, U. Drought stress and carbon assimilation in a warming climate: Reversible and irreversible impacts. **Journal Plant Physiology**, xxx- xxx, 2016.

FELLER, U.; VASEVA, I. Extreme climatic events: impacts of drought and high temperature on physiological processes in agronomically important plants. **Frontiers in Environmental**, v.2, p.1-17, 2014.

FIRMANO, R. S.; KUWAHARAI, F. A.; SOUZA, G. M. Relação entre adubação fosfatada e deficiência hídrica em soja. **Ciência Rural**, v.39, n.7, p.1967-1973, 2009.

FISCHER, A. J.; GRANADOS, E.; TRUJILLO, D. Propanil resistance in populations of junglerice (*Echinochloa colona*) in Colombian rice fields. **Weed Science**, v.41, p.201–206, 1993.

FLECK, N.G.; AGOSTINETTO, D.; GALON, L.; SCHAEGLER, C.E. Competitividade relativa entre cultivares de arroz irrigado e biótipo de arroz-vermelho. **Planta Daninha**, v.26, p.101-111, 2008.

FOYER, C.H.; NOCTOR, G. Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation and practical implications. **Signal Antioxidants and Redox Signaling**, v. 11, p. 861-905, 2009.

FRAGKOSTEFANAKIS, S.; RÖTH, S; SCHLEIFF, E.; SCHARF, K.D. Prospects of engineering thermotolerance in crops through modulation of heat stress transcription factor and heat shock protein networks. **Plant, Cell and Environment**. v.38, p.1881-1895, 2015.

FROVA, C. The plant glutathione transferase gene family: genomic structure, functions, expression and evolution. **Physiologia Plantarum**, v.119, p.469–479, 2003.

FRYER, M.J.; BALL, L.; OXBOROUGH, K.; KARPINSKI, S.; MULLINEAUX, P.M.; BAKER, N.R. Control of *Ascorbate peroxidase 2* expression by hydrogen peroxide and leaf water status during excess light stress reveals a functional organization of *Arabidopsis* leaves. **The Plant Journal**, v.33, p.691–705, 2003.

FUKAYAMA, H.; FUKUDA, T.; MASUMOTO, C.; TANIGUCHI, Y.; SAKAI, H.; CHENG, W.; HASEGAWA, T.; MIYAO, M. Rice plant response to long term CO₂ enrichment: Gene expression profiling. **Plant Science**, v.177, p.203-210, 2009.

FUKUDA, N. Advanced light control technologies in protected horticulture: A review of morphological and physiological response in plants to light quality and its applications. **Agronomy for Sustainable Development**, v.40, p.32-40, 2013.

FUKUDA, N.; YOSHIDA, T.; OLSEN, J.E.; SENAHA, C.; JIKUMARU, Y.; KAMIVA, Y. Short main shoot length and inhibition of floral bud development under red light can be recovered by application of gibberellin and cytokinin. **Acta Horticulturae**. v.956, p.215-222, 2012.

GALILI, S.; AVIVI, Y.; FELDMAN, M. Differential expression of three RbcS subfamilies in wheat. **Plant Science**, v.139, p.185– 193,1998.

GALLI, V.; BOROWSKI, J.M.; PERIN, E.C.; MESSIAS, R.S.; LABONDE, J.; PEREIRA, I.S.; SILVA, S.D.A.; ROMBALDI, C.V. Validation of reference genes for accurate normalization of gene expression for real time-quantitative PCR in strawberry fruits using different cultivars and osmotic stress. **Gene**, v.554, p.205-214, 2015.

GALON, L; AGOSTINETTO, D.; MORAES, P.V.D.; DAL MAGRO, T.; PANOZZO, L.E.; BRANDOLT, R.R.; SANTOS, L.S. Economic threshold level for barnyardgrass (*Echinochloa* spp.) control decision in flooded rice (*Oryza sativa*). **Planta Daninha**, v.25, p.709-718, 2007.

GEALY, D.R.; AGRAMA, H.; JIA, M.H. Genetic analysis of atypical U.S. red rice phenotypes: indications of prior gene flow in rice fields? **Weed Science**, v.60, n.3, p.451-461, 2012.

GESCH, R.W.; BOOTE, K.J.; VU, J.C.V.; ALLEN, L.H.; BOWES, G. Changes in growth CO₂ result in rapid adjustments of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase small subunit gene expression in expanding and mature leaves of rice. **Plant Physiology**, v.118, p.512-529,1998.

GESCH, R.W.; KANG, I.H.; GALLO-MEAGHER, M.; VU, J.C.V.; BOOTE, K.L.; ALLEN, L.H.; BOWES, G. Rubisco expression in rice leaves is related to genotypic variation of photosynthesis under elevated growth CO₂ and temperature. **Plant, Cell and Environment**, v.26, p.1941-1950, 2003.

GIANNOPOLITIS, C.N., RIES, S.K. Superoxide dismutase. **Plant Physiology**, v.59, p.309-314, 1977.

GIAVENO, C.; FERRERO, J. Introduction of tropical maize genotypes to increase silage production in the central area of Santa Fe Argentina. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.3, p.89–94, 2003.

GIBERTI, S.; FUNCK, D.; FORLANI, G. D1-pyrroline-5-carboxylate reductase from *Arabidopsis thaliana*: stimulation or inhibition by chloride ions and feedback regulation by proline depend on whether NADPH or NADH acts as co-substrate. **New Phytologist**, v. 202, p. 911-919, 2014.

GILL, S.S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in plant. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.48, p.909-930, 2010.

GORANTLA, M.; BABU, P.; LACHAGARI, V.B.R., REDDY, A.; WUSIRIKA, R.; BENNETZEN, J. L.; REDDY, A.R. Identification of stress-responsive genes in an indica rice (*Oryza sativa* L.) using ESTs generated from drought- stressed seedlings. **Journal of Experimental Botany**, v.58, p.253–265, 2007.

GOUFO, P.; PEREIRA, J.; MOUTINHO-PEREIRA, J., CORREIA, C.M.; CARRANCA, C.; ROSA, E.A.S.; TRINDADE, H. Rice (*Oryza sativa* L.) phenolic compounds under elevated carbon dioxide (CO₂) concentration. **Environmental and Experimental Botany**, v.99, p.28-37, 2014.

GOVINDJEE, E. Sixty-three years since Kautsky: Chlorophyll a fluorescence. **Australian Journal of Plant Physiology**, v.22, p.131–160, 1995.

GRIGOROVA, B.; VASEVA, I.I.; DEMIREVSKA, K.; FELLER, U. Expression of selected heat shock proteins after individually applied and combined drought and heat stress. **Acta Physiologiae Plantarum**, v.33, p.2041-2049, 2011.

GUO, T.R.; ZHANG, G.P.; ZHANG, Y.H. Physiological changes in barley plants under combined toxicity of aluminum, copper and cadmium. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.57, p.182–188, 2007.

GUTIERREZ, L.; MAURIAT, M.; BELLINI, C.; WUYTSWINKEL, O. Towards a systematic validation of references in real-time RT-PCR. **Plant Cell**, v.20, p.1734–1735, 2008.

HASANUZZAMAN, M.; HOSSAIN, M.A.; DA SILVA, J.T.; FUJITA, M. Plant responses and tolerance to abiotic oxidative stress: antioxidant defenses are a key factor. In: Bandi V., Shanker A.K., Shanker C., Mandapaka M. **Crop Stress and its Management: Perspectives and Strategies** Springer, Berlin, 2012; p.261-316.

HASHIGUCHI, A.; AHSAN, N.; KOMATSU, S. Proteomics application of crops in the context of climatic changes. **Food Research International**, v.43, p.1803–1813, 2010.

HASSAN, I.A. Effects of water stress and high temperature on gas exchange and chlorophyll fluorescence in *Triticum aestivum* L. **Brief Communication Photosynthetica**, v.44, p.312–315, 2006.

HATFIELD, J.L.; BOOTE, K.J.; KIMBALL, B.A.; ZISKA, L.H.; IZAURRALDE, R.C.; ORT, D.; THOMSON, A.M.; WOLFE, D. Climate impacts on agriculture: implications for crop production. **Agronomy Journal**, v.103, p.351–370, 2011.

HAVAUX, M.; NIYOGI, K.K. The violaxanthin cycle protects plants from photooxidative damage by more than one mechanism. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, v. 96, p. 8762–8767, 1999.

HAYAT, S.; HAYAT, Q.; ALYEMENI, M.N.; WANI, A.S.; PICHTEL, J.; AHMAD, A. Role of proline under changing environments, **Plant Signaling & Behavior**, v.7, p.1-11, 2012.

HEAP, I. The International Survey of Herbicide Resistant Weeds. Disponível em < www.weedscience.org>. Acesso em: 7 Fev. 2017.

HEATH, R.L.; PACKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.125, p.189-198, 1968.

HELDT, H. **Plant biochemistry and molecular biology**. New York: Oxford University Press, 1997. 522 p.

HELDT, H.W.; HELDT, F. Phenylpropanoids comprise a multitude of plant secondary metabolites and cell wall components. In: HELDT, H.W. **Plant biochemistry**. San Diego: Academic, 2005. p.435-454.

HISCOX, J.D.; ISRAELSTAM, G.F. A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. **Canadian Journal of Botany**, v.57, p.1132-1334, 1979.

HOAGLAND, R.E.; NORSWORTHY, J.K.; CAREY, F.; TALBERT, R.E. Metabolically based resistance to the herbicide propanil in *Echinochloa* species. **Weed Science**, v.52, p.475-486, 2004.

HOGEWONING, S.W.; TROUWBORST, G.; MALJAARS, H.; POORTER, H.; VAN LEPEREN, W.; HARBINSON, J. Blue light dose-responses of leaf photosynthesis, morphology, and chemical composition of *Cucumis sativus* grown under different combinations of red and blue light. **Journal of Experimental Botany**, v.61, p.3107–3117, 2010.

HOLM, L.G.; PLUCKNETT, D.L.; PANCHO, J.V.; HERBERGER, J.P. **The World's Worst Weeds: Distribution and Biology**. 1.ed. The University Press of Hawaii: Malabar, 2013, 609p.

HOLT, J.S.; THILL, D.C. **Growth and productivity of resistant plants. Herbicide Resistance in Plants: Biology and Biochemistry**. CRC Press, Boca Raton, FL, USA. 1994, p. 299–316.

HONG, C.Y.; HSU, Y.T.; TSAI, Y.C.; KAO, C.H. Expression of ascorbate peroxidase 8 in roots of rice (*Oryza sativa* L.) seedlings in response to NaCl. **Journal of Experimental Botany**, v.58, p.3273–3283, 2007.

HU, X.; LIU, R.; LI, Y.; WANG, W.; TAI, F.; XUE, R.; LI, C. Heat shock protein 70 regulates the abscisic acid-induced antioxidant response of maize to combined drought and heat stress. **Plant Growth Regulation**. v.60, p.225–235, 2010.

IBA, K. Acclimative response to temperature stress in higher plants: approaches of gene engineering for temperature tolerance. **Annual Review Plant Biology** v.53, p.225–245. 2002.

INOUE, S.; KINOSHITA, T. Blue light regulation of stomatal opening and the plasma membrane H⁺ - ATPase. **Plant Physiology**, v.2, p.1-10, 2017.

IPCC – Intergovernmental panel on climate change. Climate Change 2014. Disponivel em <<http://www.ipcc.ch/>>. Acesso em: 15 Fev. 2017.

IRRI- Rice Almanac: Source Book for the Important Economic Activity on Earth. CABI Publishing, Oxon, UK, p.1–62, 2002.

IWAKAMI, S.; ENDO, M.; SAIKA, H.; OKUNO, J.; NAKAMURA, N.; YOKOYAMA, M.; WATANABE, H.; TOKI, S.; UCHINO, A.; INAMURA, T. Cytochrome P450 CYP81A12 and CYP81A21 are associated with resistance to two acetolactate synthase inhibitors in *Echinochloa phyllopogon*. **Plant Physiology**, v.165, p.618-629, 2014.

JAGADISH, S.V., MUTHURAJAN, R., OANE, R., WHEELER, T.R., HEUER, S., BENNETT, J.; CRAUFURD, P.Q. Physiological and proteomic approaches to address heat tolerance during anthesis in rice (*Oryza sativa* L.). **Journal of Experimental Botany**, v.61, p.143-156, 2010.

JAIN, M.; NIJHAWAN, A.; TYAGI, A.K.; KHURANA, J.P. Validation of housekeeping genes as internal control for studying gene expression in rice by quantitative real-time PCR. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.345, p.646–651, 2006.

JALEEL, C.A.; GOPI, R.; SANKAR, B.; GOMATHINAYAGAM, M.; PANNEERSELVAM, R. Differential responses in water use efficiency in two varieties of *Catharanthus roseus* under drought stress. **Comptes Rendus Biologies**, v.331, p.42-47, 2008.

JALEEL, C.A.; MANIVANNAN, P.; WAHID, A.; FAROOQ, M.; AL-JUBURI, H.J.; SOMASUNDARAM, R.; PANNEERSELVAM, R. Drought stress in plants: A review on morphological characteristics and pigments composition. **International Journal of Agricultural and Biological**, v.11, p.100–105, 2009.

JIAO, Y.L.; LAU, O.S.; DENG, X. W. Light-regulated et al. Light-regulated transcriptional networks in higher plants. **Nature Reviews Genetics**, v.8, p.217-230, 2007.

JOHKAN, M.; SHOJI, K.; GOTO, F.; HASHIDA, S.N.; YASHIHARA, T. Blue light-emitting diode light irradiation of seedlings improves seedling quality and growth after transplanting in red leaf lettuce. **Hortscience**. v.45, p.1809–1814, 2010.

JONES, D.P.; SIES, H. The redox code. **Antioxidants and Redox Signaling**, v.23, p.734–746, 2015.

KAISER, E.; MORALES, A.; HARBINSON, J.; KROMDIJK, J.; HEUVELINK, E.; MARCELIS, L.F.M. Dynamic photosynthesis in different environmental conditions. **Journal of Experimental Botany**, v.66, p.2415-2426, 2015.

KANG, J.H.; KRISHNKUMAR, S.; SUA ATULBA, S.L.; JEONG B.R.; HWANG, S.J. Light intensity and photoperiod influence the growth and development of hydroponically grown leaf lettuce in a closed-type plant factory system. **Horticulture, Environment, and Biotechnology**, v.54, p.501–509, 2013.

KARAMANOS A.J. The involvement of proline and some metabolites in water stress and their importance as drought resistance indicators. **Bulgarian Journal of Plant Physiology**, v.21, p.98–110, 2013.

KAVAR, T.; MARAS, M.; KIDRIC, M.; SUSTAR-VOZLIC, J.; MEGLIC, V. Identification of genes involved in the response of leaves of *Phaseolus vulgaris* to drought stress, **Molecular Breeding**, v.21, p.159–172, 2007.

KEVEI, E.; SCHAFER, E.; NAGY, F. Light-regulated nucleo-cytoplasmic partitioning of phytochromes. **Journal of Experimental Botany**, v.58, p.3113–3124, 2007.

KHUSH, G S. What it will take to feed 5.0 billion rice consumers in 2030. **Plant Molecular Biology**, v.59, p.1-6, 2005.

KIM, B.R.; NAM, H.Y.; KIM, S.U.; KIM, S.I.; CHANG, Y.J. Normalization of reverse transcription quantitative-PCR with housekeeping genes in rice. **Biotechnol, Letters**, v.25, p.1869–1872, 2003.

KIM, D.S.; CASELEY, J.C.; BRAIN, P.; RICHES, C.R.; VALVERDE, B.E. Rapid detection of propanil and fenoxaprop resistance in *Echinochloa colona*. **Weed Science**, v.48, p.695–700, 2000.

KIM, K.; KOOK, H.S.; JANG, Y.J.; LEE, W.H.; KAMALA-KANNAN, S.; CHAE, J.C.; LEE, K.J. The effect of blue-light-emitting diodes on antioxidant properties and resistance to *Botrytis cinerea* in tomato. **Journal of Plant Pathology & Microbiology**, v.4, p.49–60, 2013.

KIMBALL, S.; GREMER, J.R.; ANGERT, A.L.; HUXMAN, T.E.; VENABLE, D.L. Fitness and physiology in a variable environment. **Oecologia**, v.169, p.319–329, 2012.

KISSMANN, K. G.; GROTH, D. **Plantas infestantes e nocivas**. 2^a ed. São Bernardo, do Campo: Basf, 1999, 978p.

KOTAK, S.; LARKINDALE, LEE, U.; VON KOSKULL-DORING, P.; VIERLING, E.; SCHARF, K.D. Complexity of heat stress response in plants. **Plant Biology**, v.10, p.310–316, 2007.

KRINSKY, N.I. Antioxidant function of carotenoids. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 7, p. 617–35, 1989.

KRISHNA, P.; GLOOR, G. The Hsp90 family of proteins in *Arabidopsis thaliana*. **Cell Stress Chaperones**, v.6, p.238–246, 2001.

KUMAR, A.; DIXIT, S.; RAM, T.; YADAW, R.B.; MISHRA, K.K.; MANDAL, N.P. Breeding high-yielding drought-tolerant rice: Genetic variations and conventional and molecular approaches. **Journal of Experimental Botany**, v.65, p.6265–6278, 2014.

KUMAR, A.; LI, C.; PORTIS, A.R. JR. *Arabidopsis thaliana* expressing a thermostable chimeric Rubisco activase exhibits enhanced growth and higher rates

of photosynthesis at moderately high temperatures. **Photosynthesis Research**, v.100, p.143–153, 2009.

KVARATSKHELIA, M.; WINKEL, C.; THORNELEY, R.N.F. Purification and characterization of a novel class in peroxidase isoenzyme from tea leaves. **Plant Physiology**, v. 114, p. 1237-1245, 1997.

LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos: Rima Artes e Textos, 2004. 531p.

LE, D.T. ALDRICH, D.L.; VALLIYODAN, B.; WATANABE, Y.; HA, C.V. Valuation of candidate reference genes for normalization of quantitative RT-PCR in soybean tissues under various abiotic stress conditions. **PLoS One**, v.7, p.1-10, 2012.

LEDFORD, H.K.; NIYOGI, K.K. Singlet oxygen and photo-oxidative stress management in plants and algae. **Plant Cell and Environment**, v. 28, p.1037-1045, 2005.

LEFSRUD, M.G. Irradiance from distinct wavelength light- emitting diodes affects secondary metabolites in kale. **Hortscience**, v.43, p.2243–2244, 2008.

LI, G.; WU, S.G.; YU, R.X.; CANG, T.; CHEN, T.; ZHAO, X.P.; CAI, L.M.; WU, C.X. Identification and expression pattern of a glutathione S-transferase in *Echinochloa crus-galli*. **Weed Research**, v. 53, p. 314-321, 2013a.

LI, H.; TANG, C.; XU, Z. The effects of different light qualities on rapeseed (*Brassica napus* L.) plantlet growth and morphogenesis in vitro. **Scientia Horticulturae**, v.150, p.117-124, 2013b.

LI, H.; TANG, C.; XU, Z.; LIU, X.; HAN, X. Effects of different light sources on the growth of non-heading chinese cabbage (*Brassica campestris* L.). **Journal of Agricultural Science**, v.4, p.262–273, 2012.

LI, H.M.; XU, Z.; TANG, C. Effect of light emitting diodes on growth and morphogenesis of upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.) plantlets in vitro. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.103, P.155–163, 2010.

LI, S.M.; BAO-ZHEN, L.I.; WEI-MING, S. Expression Patterns of Nine Ammonium Transporters in Rice in Response to N Status. **Pedosphere**. v.22, p.860–869, 2012.

LICHTENTHALER, H.K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic bio membranes. **Methods in Enzymology**, v.148, p.350-381, 1987.

LIN, K.H.; HUANG, M.Y.; HUANG, W.D.; HSU, M.H.; YANG, Z.W.; YANG, C.M. The effects of red, blue, and white light-emitting diodes on the growth, development, and edible quality of hydroponically grown lettuce (*Lactuca sativa* L. var. capitata). **Scientia Horticulturae**, v.150, p.86–91, 2013.

LIU, Z.J.; ZHANG, X.L.; BAI, J.G.; SUO, B.X.; XU, P.L.; WANG, L. Exogenous paraquat changes antioxidant enzyme actives and lipid peroxidation in drought stressed cucumber leaves. *Scientia Horticulturae*, v. 121, p. 138-143, 2009.

LOCATO, V.; PINTO, M.C.; PARADISO, A.; DE GARA, L. Reactive oxygen species and ascorbate- glutathione interplay in signaling and stress responses. In: GUPTA, S.D. **Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants**. Enfield: Science Publishers, 2010. p.45-64.

LONG, S.P.; AINSWORTH, E.A.; LEAKEY, A.D.B.; NÖSBERGER, J.; ORT, D.R. Food for thought: lower than expected crop yield stimulation with rising CO₂ concentrations. **Science**, v.312, p.1918–1921, 2006.

LOPEZ-MARTINEZ, N., MARSHALL, G., DE PRADO, R. Resistance of barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*) to atrazine and quinclorac. **Pesticide Science**, v.51, p.171-175, 1997.

LUM, M.S.; HANAFI, M.M.; RAFII, Y.M.; AKMAR, S.N. Effect drought stress on growth, proline and antioxidant enzyme activities of upland rice. **The journal of Animal and Plant Science**, v.24, p.1487-1493, 2014.

MACEDO, A.F.; MARCOS, V.L.; TAVARES, E.S.; LAGE, C.L.S.; ESQUIBEL, M.A. The effect of light quality on leaf production and development of in vitro-cultured plants of *Alternanthera brasiliensis* Kuntze. **Environmental and Experimental Botany**, v.70, p.43–50, 2011.

MADAN, P.; JAGADISH, S.V.K.; CRAUFURD, P.Q.; FITZGERALD, M.; LAFARGE, T.; WHEELER, T.R. Effect of elevated CO₂ and high temperature on seed-set and grain quality of rice. **Journal of Experimental Botany**, v.63, p.3843–3852, 2012.

MAISURA, C.M.A.; LUBIS, I.; JUNAEDINAND, A.; EHARA, H. Some physiological character responses of rice under drought conditions in a paddy system. **ISSAAS Journal**, v.20, p.104–114, 2014.

MAKINO, A.; MAE, T.; OHIRA, K. Photosynthesis and ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase in rice leaves from emergence through senescence. Quantitative analysis by carboxylation/oxygenation and regeneration of ribulose 1,5-bisphosphate. **Planta**, v.166, p.414–420. 1985.

MANEA, A.; LEISHMAN, M.R.; DOWNEY, P.O. Exotic C4 grasses have increased tolerance to glyphosate under elevated carbon dioxide. **Weed Science**, v. 59, p.28-36, 2011.

MARAMBE, B.; AMARASINGHE, L. Propanil-resistant barnyardgrass [*Echinochloa crus-galli* (L.) Beauv.] in Sri Lanka: Seedling growth under different temperatures and control. **Weed Biology and Management**, v. 2, p. 194-199, 2002.

MARCHESAN, E. Arroz-vermelho: Caracterização, prejuízos e controle. **Ciência Rural**, v.24, n.2, p.415-421, 1994.

MAROCO, J.P.; EDWARDS, G.E.; KU, M.S.B. Photosynthetic acclimation of maize to growth under elevated levels of carbon dioxide. **Planta**, v.210, p.115–125, 1999.

MAROUFI, A.; VAN BOCKSTAELE, E.; DE LOOSE, M. Validation of reference genes for gene expression analysis in chicory (*Cichorium intybus*) using quantitative real-time PCR. **BMC Molecular Biology**, v.11, p.15-25, 2010.

MARTINS, M.Q.; RODRIGUES, W.P.; FORTUNATO, A.S.; LEITÃO, A.E.; RODRIGUES, A.P.; PAIS, I.P.; MARTINS, L.D.; SILVA, M.J.; REBOREDO, F.H.; PARTELLI, F.L.; CAMPOSTRINI, E.; TOMAZ, M.A; SCOTTI-CAMPOS, P.; RIBEIRO-BARROS, A.; LIDON, F.J.C.; DAMATTA, F.M.; RAMALHO, J.C. Protective response mechanisms to heat stress in interaction with high [CO₂] conditions in *Coffea* spp. **Frontiers in Plant Science**. v.7, p.1-18, 2016.

MASSA, G., GRAHAM, T.; HAIRE, T.; FLEMMING, C.; NEWSHAM, G.; WHEELER, R. Light-emitting diode light transmission through leaf tissue of seven different crops. **HortScience**, v.50, p.501–506, 2015.

MATSUURA, H.; ISHIBASHI, Y.; SHINMYO, A.; KANAYA, S.; KATO, K. Genome-wide analyses of early translational responses to elevated temperature and high salinity in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Cell Physiology**, v.51, p.448-462, 2010.

MATTERS, G.L.; SCABDALIOS, J.G. Effect of elevated temperature on catalase and superoxide dismutase during maize development. **Differentiation**, v.30, p.190-210, 1986.

MATYSIK, J.; ALIA, B.; BHALU, B.; MOHANTY, P. Molecular mechanisms of quenching of reactive oxygen species by praline under stress in plants. **Current Science**, v. 82, p. 525-532, 2002.

MATZENBACHER, F.O.; BORTOLY, E.D.; KALSING, A.; MEROTTO, A. Distribution and analysis of the mechanisms of resistance of barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*) to imidazolinone and quinclorac herbicides. **The Journal of Agricultural Science**, v.153, p.1044-1058, 2015.

MARTEN, I.; DEEKEN, R.; HEDRICH, R.; ROELFSEMA, M.R. Light-induced modification of plant plasma membrane ion transport. **Plant Biology**, v.12, p.64-79, 2010.

Mc CREE, K.J. Test of current definitions of photosynthetically active radiation against leaf photosynthesis data. **Agricultural Meteorology**, v.10, p.443–453, 1972.

Mc KEOWN, A.; WARLAND, J.; McDONALD, M.R. Long-term marketable yields of horticultural crops in southern Ontario in relation to seasonal climate. **Canadian Journal of Plant Science**, v.85, p.431–438, 2005.

MEDEIROS, J.S.; WARD, J.K. Increasing atmospheric [CO₂] from glacial to future concentrations affects drought tolerance via impacts on leaves, xylem and their integrated function. **New Phytologist**, v.199, p.738–748, 2013.

MEDICI, L.O.; AZEVEDO, R.A.; CANELLAS, L.P.; MACHADO, A.T.; PIMENTEL, C. Stomatal conductance of maize under water and nitrogen deficits. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.42, p.599-601, 2007.

MEDVIGY, D.; BEAULIEU, C. Trends in daily solar radiation and precipitation coefficients of variation since 1984. **Journal of Climate**, v.25, p.1330–1339, 2012.

MENCHARI, Y.; CHAUVEL, B.; DARMENCY, H.; DELYE, C. Fitness costs associated with three mutant acetyl-coenzyme A carboxylase alleles endowing herbicide resistance in black-grass *Alopecurus myosuroides*. **Journal of Applied Ecology**, v.45, p.939–947, 2008.

MERROTTO Jr., A.; FISCHER, A.J.; VIDAL, R.A. Perspectives for using light quality knowledge as an advanced ecophysiological weed management tool. **Planta Daninha**, v.27, p.407–419, 2009.

MERTZ-HENNING, L.M.; PEGORARO, C.; MAIA, L.C.; VENSKE, E.; ROMBALDI, C.V.; COSTA de OLIVEIRA, A. expression profile of rice *Hsp* genes under anoxic stress. **Genetics and Molecular Research**, v.15, p.1–13, 2016.

MICHEL, B.E.; KAUFMANN, M.R. The osmotic potential of polyethylene glycol 6000. **Plant Physiology**, v.51, p.914–916, 1973.

MILLER, G.; SUZUKI, N.; CIFTCI-YILMAZ, S.; MITTLER, R. Reactive oxygen species homeostasis and signaling during drought and salinity stresses. **Plant, Cell and Environment**, v.33, p.453–467, 2011.

MITTAL, N.; MISHRA, A.; SINGH, R.; KUMAR, P. Assessing future changes in seasonal climatic extremes in the Ganges river basin using an ensemble of regional climate models. **Climate Change**, v.123, p.273–286, 2014.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Plant Science**, v.7, p. 405–410, 2002.

MIZUNO, T.; AMAKI, W.; WATANABE, H. Effects of monochromatic light irradiation by LED on the growth and anthocyanin contents in leaves of cabbage seedlings. **Acta Horticulturae**, v.907, p.179–184., 2011.

MUNEER, S.; KIM, E.J.; PARK, J.P.; LEE, J.H. Influence of green, red and blue light emitting diodes on multiprotein complex proteins and photosynthetic activity under different light intensity in Lettuce leaves (*Lactuca sativa* L.). **International Journal of Molecular Sciences**, v.15, p.4657–4670, 2014.

MUTHA, R.S.; MUTHULAKSMI, W.; BABY-RANI, K.; INDIRA, M.P. Studies on biochemical basis of heat tolerance in sunflower (*Helianthus annuus* L.). **Research journal of agriculture and biological sciences**, v.3, p.234–238, 2007.

MYERS, S.S.; ZANOBBETTI, A.; KLOOG, I.; HUYBERS, P.; LEAKEY, A.D.B.; BLOOM, A.J.; CARLISLE, E.; DIETTERICH, L.H.; FITZGERALD, G.; HASEGAWA, T.; HOLBROOK, N.M.; NELSON, R.L.; OTTMAN, M.J.; SAKAI, H.; SARTOR, K.A.; SCHWARTZ, J.; SENEWEERA, S.; TAUSZ, M.; USUI, Y. Increasing CO₂ threatens human nutrition. **Nature** v.510, p.139–140, 2014.

NICHOLSON, R. L.; HAMMERSCHMIDT, R. Phenolic compounds and their role in disease resistance. **Annual Review of Phytopathology**, v. 30, p. 369-89, 1992.

NOCTOR, G.; FOYER, C.H. A re-evaluation of the ATP: NADPH budget during C3 photosynthesis. A contribution from nitrate assimilation and its associated respiratory activity? **Journal of Experimental Botany**, v. 49, p. 1895-1908, 1998.

NOCTOR, G.; LELARGE-TROUVERIE, C.; MHAMDI, A. The metabolomics of oxidative stress. **Phytochemistry**, v.112, p.33-53, 2015.

NOCTOR, G.; MHAMDI, A.; FOYER, C.H. Oxidative stress and antioxidative systems: recipes for successful data collection and interpretation. **Plant, Cell & Environment**, v.39, p. 1140-1160, 2016.

OGREN W.L. Photorespiration: pathways, regulation, and modification. **Annual Review of Plant Physiology** v.35; p.415–442, 1984.

OLLE, M.; VIRSILE, A. The effects of light emitting diode on greenhouse plant growth and quality. **Agriculture Food Science**, v.22, p.223–234, 2013.

PAGES, C. Continental-scale temperature variability during the past two millennia. **Nature Geoscience**, v.6, p.339–346, 2013.

PAIVA, A.S.; FERNANDES, E.J.; RODRIGUES, T.J.D.; TURCO, J.E.P. Condutância estomática em folhas de feijoeiro submetido a diferentes regimes de irrigação. **Engenharia Agrícola**, v.25, n.1, p.161-169, 2005.

PAOLACCI, A.R., TANZARELLA, O.; PORCEDDU, E.; CIAFFI, M. Identification and validation of reference genes for quantitative RT-PCR normalization in wheat. **BMC Molecular Biology**, v.10, p.11, 2009.

PEIXOTO, P.H.P. Aluminum effects on lipid peroxidation and on the activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.11, p.137-143, 1999.

PERL, A.; PERL-TREVES, R.; GALILI, S.; AVIV, D.; SHALGI, E.; MALKIN, S.; GALUN, E. Enhanced oxidative-stress defense in transgenic potato expressing tomato Cu, Zn superoxide dismutases. **Theoretical and Applied Genetics**, v.85, p.568-576, 1993.

PINTO, J.J.O.; GALON, L.; DAL MAGRO, T.; PROCÓPIO, S.O.; CONCENÇO, G.; PINHO, C.F.; FERREIRA, E.A. Controle de capim-arroz (*Echinochloa* spp.) em função de métodos de manejo na cultura do arroz irrigado. **Planta Daninha**, v. 26, p.767-777, 2008.

PRITCHARD, S.G.; ROGERS, H.H.; PRIOR, S.A.; PETERSON, C.M. Elevated CO₂ and plant structure: a review. **Global Change Biology**, v.5, p.807–837, 1999.

PURRINGTON, C.B.; BERGELSON, J. Fitness consequences of genetically engineered herbicide and antibiotic resistance in *Arabidopsis thaliana*. **Genetics**, v.145, p.807–814, 1997.

RADOSEVICH, S.R.; HOLT, J.S.; GHERSA, C.M. **Ecology of weeds and invasive plants**: relationship to agriculture and natural resource management. 3.ed. Hoboken Wiley, 2007. 454p.

RAINES, C.A. Transgenic approaches to manipulate the environmental responses of the C3 carbon fixation cycle. **Plant, Cell and Environment**, v.29, p.331-339, 2006.

RAJCAN, I.; CHANDLER, K. J.; SWANTON, C. J. Red- far-red ratio of reflected light: a hypothesis of why early season weed control is important in corn. **Weed Science**, v.52, p.774-778, 2004.

RAJU, S.; SHAH, S.; GAIBHIVE, N. Effect of light intensity on photosynthesis and of sennosides in plant parts of senna (*Cassia angustifolia* Vahl.). **Indian Journal of Plant Physiology**, v.3, p.285–289, 2013.

RAMACHANDRA, C.; DENESH, G.R.; RAMACHANDRA, P.T.V. Chemical weed control in dry rice nursery. In: PROCEEDINGS OF THE BIENNIAL CONFERENCE OF INDIAN SOCIETY OF WEED SCIENCE ON WEED THREAT TO AGRICULTURE, BIODIVERSITY AND ENVIRONMENT, INDIAN SOCIETY OF WEED SCIENCE. 91, 2012, Kerala, India, **Anais...** Kerala Agricultural University, 2012.

RAO, A.N.; JOHNSON, D.E.; SIVAPRASAD, B.; LADHA, J.K.; MORTIMER, A.M.; Weed management in direct-seeded rice. **Advances in Agronomy**, v.93, p.153-255, 2007.

RAY, S. Modulation of transcription factor and metabolic pathway genes in response to water-deficit stress in rice. **Functional & Integrative Genomics**. v.11, p.157–178, 2011.

REDA, F.; MANDOURA, H.M.H. Response of enzymes activities, photosynthetic pigments, proline to low or high temperature stressed wheat plant (*Triticum aestivum* L.) in the presence or absence of exogenous proline or cysteine. **International Journal of Academic Research**, v.3, p.108-115, 2011.

RIAR, D.S.; NORSWORTHY, J.K.; BOND, J.A.; BARARPOUR, M.T.; WILSON, M.J.; SCOTT, R.C. Resistance of *Echinochloa crus-galli* populations to acetolactate synthase-inhibiting herbicides. **International Journal of Agronomy**, v.12, p.58-66, 2012.

RICHTER, K.; HASLBECK, M.; BUCHNER, J. Review The Heat Shock Response : Life on the Verge of Death. **Molecular Cell**. v.40, p.253–266, 2010.

RIVERO, R.M.; RUIZ, J.M.; ROMERO, L. Oxidative metabolism in tomato plants subjected to heat stress. **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v.79, p.560–564, 2004.

RIZHSKY, L.; LIANG, H.; MITTLER, R. The combined effect of drought stress and heat shock on gene expression in tobacco. **Plant Physiology**, v.130, p.1143–1151, 2002.

RODZIEWICZ, P.; SWARCEWICZ, B.; CHMIELEWSKA, K.; WOJAKOWSKA, A.; STOBIECKI, M. Influence of abiotic stresses on plant proteome and metabolome changes. **Acta Physiologiae Plantarum**, v.36, p.1-19, 2014.

ROLLINS, J.A.; HABTE, E.; TEMPLER, S.E.; COLBY, T.; SCHMIDT, J.; VON KORFF, M. Leaf proteome alterations in the context of physiological and morphological responses to drought and heat stress in barley (*Hordeum vulgare* L.). **Journal of Experimental Botany**, v.64, p.3201-3212, 2013.

ROSA, S.B.; CAVERZAN, A.; TEIXEIRA, F.K.; LAZZAROTTO, F.; SILVEIRA, J.A.G.; FERREIRA-SILVA, S.L.; ABREU-NETO, J., MARGIS, R., MARGIS-PINHEIRO, M. Cytosolic APx knock indicates an ambiguous redox response in rice. *Phytochemistry*, v.548, p. 548-558, 2010.

SACKS, M.M.; SILK, W.K.; BURMAN, P. Effect of water stress on cortical cell division rates within the apical meristem of primary roots of maize. **Plant Physiology**, v.114, p.519-527, 1997.

SAIBO, N.J.M.; LOURENÇO, T.; OLIVEIRA, M.M. Transcription factors and regulation of photosynthetic and related metabolism under environmental stresses. **Annals of Botany**, v.103, p.609-623, 2009.

SAIDI, Y.; FINKA, A.; GOLOUBINOFF, P. Heat perception and signaling in plants: a tortuous path to thermotolerance. **New Phytologist**, v.190, p.556-565, 2011.

SASANUMA, T. Characterization of the rbcS multigene family in wheat: subfamily classification, determination of chromosomal location and evolutionary analysis. **Molecular and General Genetics**, v.265, p.161–171, 2001.

SATO, Y.; YOKOYA, S. Enhanced tolerance to drought stress in transgenic rice plants over-expressing a small heat-shock protein, *sHSP17.7*. **Plant Cell Reports**, v.27; p.329–334, 2008.

SAYED, O.H.; EARNSHAW, M.J.; EMES, M.J. Photosynthetic responses of different varieties of wheat to high temperature: II. Effect of heat stress on photosynthetic electron transport. **Journal of Experimental Botany**, v.40, p.633–638, 1989.

SCHAT, H.; SHARMA, S.S.; VOOIJS, R. Heavy metal-induced accumulation of free proline in a metal-tolerant and a non-tolerant ecotype of *Silene vulgaris*. **Physiologia Plantarum**, v. 101, p. 477-482, 1997.

SCHOBERT, B., TSCHESCHE, H. 1978. Unusual solution properties of pro- line and its interactions with proteins. **Biochemical et Biophysica Acta**, v.541, p.270-277, 1978.

SCHRADER, S.M.; WISE, R.R.; WACHOLTZ, W.F.; ORT, D.R.; SHARKEY, T.D.; Thylakoid membrane responses to moderately high leaf temperature in Pima cotton. **Plant, Cell and Environment**, v.27, p.725-735, 2004.

SILVA, A.A.; SILVA, J.F. **Tópicos em manejo de plantas daninhas**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2007. 367p.

SELOTE, D.S.; KHANNA-CHOPRA, R. Drought-induced spikelet sterility is associated with an inefficient antioxidant defense in rice panicles. **Physiologia Plantarum**, v.121, p.462–471, 2004.

SEN-GUPTA, A.; HEINEN, J.L.; HOLADAY, A.S.; BURKE, J.J.; ALLEN, R.D. Increased resistance in transgenic plants that overexpress chloroplastic Cu/Zn superoxide dismutase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.90, p.1629–1633, 1993.

SERGIEV, I.; ALEXIEVA, V.; KARANOV, E. Effect of spermine, atrazine and combination between them on some endogenous protective systems and stress markers in plants. **Comptes Rendus de l'Academie Bulgare des Sciences**, v.51, p.121-134, 1997.

SERRAJ, R.; MCNALLY, K.L.; SLAMET-LOEDIN, I.; KOHLI, A.; HAEFELE, S.M.; ATLIN, G.; KUMAR, A. Drought resistance improvement in rice: an integrated genetic and resource management strategy. **Plant Production Science**, v.14, p.1–14, 2011.

SHA, X.Y.; LINScombe, S.D.; GROTH, D.E. Field evaluation of imidazolinone-tolerant clearfield rice (*Oryza sativa* L.) at nine Louisiana locations. **Crop Science**, v.47, p.1177–1185, 2007.

SHAH, N.H.; PAULSEN, G.M. Interaction of drought and high temperature on photosynthesis and grain-filling of wheat. **Plant Soil**, v.257, p.219–226, 2003.

SHAHBAZIAN, D.; PARSYAN, A.; PETROULAKIS, E.; TOPISIROVIC, I.; MARTINEAU, Y.; GIBBS, B.F.; SVITKIN, Y.; SONENBERG, N. Control of cell survival and proliferation by mammalian eukaryotic initiation factor 4B. **Molecular and Cellular Biology**, v.30, p.1478-1485, 2010.

SHARKEY, T. Effects of moderate heat stress on photosynthesis importance of thylakoid reactions, rubisco deactivation, reactive oxygen species, and thermotolerance provided by isoprene. **Plant, Cell and Environment**, v.28, p.269-277, 2005.

SHARMA, P.; JHA, A.B.; DUBEY, R.S.; PESSARAKLI, M. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stress full conditions. **Journal of Botany**, v. 2012, p. 1-26, 2012.

SHARMA, S.; VILLAMOR, J.G.; VERSLUES, P.E. Essential role of tissue-specific proline synthesis and catabolism in growth and redox balance at low water potential. **Plant Physiology**, v. 157, p. 292-304, 2011.

SHEHAB, G.G; AHMED, O.K.; EL-BELTAGI, H.S. Effects of various chemical agents for alleviation of drought stress in rice plants (*Oryza sativa* L.). **Notulae Botanicae Cluj-Napoca**, v.38, p.139–148, 2010.

SHIGEOKA, S.; ISHIKAWA, T.; TAMOI, M.; MIYAGAWA, Y.; TAKEDA, T.; YABUTA, Y.; YOSHIMURA, K. Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. **Journal of Experimental Botany**, v.53, p.1305-1319, 2002.

SHIVRAIN, V.K.; BURGOS, N.R.; SCOTT, R.C.; GBUR JR., E.E.; ESTORNINO, L.E JR.; McCLELLAND, M.R. Diversity of weedy red rice (*Oryza sativa* L.) in Arkansas, U.S.A. in relation to weed management. **Crop Protection**, v.29, p.721-730, 2010.

SINGH, A.; SENGAR, K.; SENGAR, R.S. Gene regulation and biotechnology of drought tolerance in rice. **International Journal of Biotechnology and Bioengineering Research**, v.4, p.547–552, 2013.

SMITH, H. Phytochromes and light signal perception by plants? An emerging synthesis. **Nature**, v.407, p.585-591, 2000.

SNIDER, J. L.; OOSTERHUIS, D.M.; KAWAKAMI, E.M. Genotypic differences in thermotolerance are dependent upon pre-stress capacity for antioxidant protection of the photosynthetic apparatus in *Gossypium hirsutum*. **Physiologia Plantarum**, v.138, p.268–277., 2010.

SOFO, A.; SCOPA, A.; NUZZACI, M. VITTI, A. Ascorbate peroxidase and catalase activities and their genetic regulation in plants subjected to drought and salinity stress, **International Journal of Molecular Science**, v.16, p.13561-13578, 2015.

SOHN, S.O.; BACK, K. Transgenic rice tolerant to high temperature with elevated contents of dienoic fatty acids. **Biologia Plantarum**, v.51, p.340-342, 2007.

SONENBERG, N.; HINNEBUSCH, A. G. Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. **Cell**, v.136, p.731-745, 2009.

SPRIGGS, K.A.; BUSHELL, M.; WILLIS, A.E. Translational regulation of gene expression during conditions of cell stress. **Molecular Cell**, v.40, p.228-237, 2010.

SPRINGER, C.J.; OROZCO, R.A.; KELLY, J.K.; WARD, J.K. Elevated CO₂ influences the expression of floral-initiation genes in *Arabidopsis thaliana*. **New Phytologist**, v.178, p.63–67, 2008.

STÜRZENBAUM, S.R.; KILLE, P. Control genes in quantitative molecular biological techniques: the variability of invariance. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.130, p.281-289, 2001.

SUGITA, M.; GRUISSEM, W. Developmental, organ-specific and light-dependent expression of the tomato ribulose-1,5- biphosphate carboxylase small subunit gene family. **National Academy of Sciences of the United States of America**, v.1, p.15-21, 1987.

SUN, W.; VAN MONTAGU, M.; VERBRUGGEN, N. Small heat shock proteins and stress tolerance in plants. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1577, p.1–9, 2002.

SUNG-RYUL, K.; AN, G. rice chloroplast-localized heat shock protein 70, OsHsp70CP1, is essential for chloroplast development under high-temperature condition. *Journal of plant physiology*, v.170, p.854-863, 2013.

SUZUKI, N.; KOUSSEVITZKY, S.; MITTLER, R.; MILLER, G. ROS and redox signaling in the response of plants to abiotic stress. **Plant, Cell and Environment**, v.35, p.259-270, 2012.

SUZUKI, N.; RIVERO, R.M.; SHULAEV, V.; BLUMWALD, E.; MITTLER, R. Abiotic and biotic stress combinations. **New Phytologist**, v.203, p.32-43, 2014.

SUZUKI, Y.; MAKINO, A. Translational downregulation of RBCL is operative in the coordinated expression of Rubisco genes in senescent leaves in rice. **Journal of Experimental Botany**, v.64, p.1145–1152, 2013.

SUZUKI, Y.; MAKINO, A.; MAE, T. Change in the turnover of rubisco and level of mRNAs of rbcL and rbcS in rice leaves from emergence to senescence. **Plant, Cell and Environment**, v.24, p.1353-1360, 2001.

SUZUKI, Y.; NAKABAYASHI, K.; YOSHIZAWA, R.; MAE, T.; MAKINO, A. Differences in expression of the rbcS multigene family and rubisco protein content in various rice plant tissues at different growth stages. **Plant and Cell Physiology**, v.50, p.1851-1855, 2009.

SZÉKELY, G.; ABRAHAM, E.; CSELO, A.; RIGO, G.; ZSIGMOND, L.; CSISZAR, J.; AYAYDIN, F.; STRIZHOV, N.; JASIK, J.; SCHMELZER, E.; KONCZ, C.; SZABADOS, L. Duplicated P5CS genes of Arabidopsis play distinct roles in stress regulation and developmental control of proline biosynthesis. **The Plant Journal**, v.53, p.11-28, 2008.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 820 p.

TALWAR, H.S.; CHANDRA, S.A.; NAGESWARA, R.C. Genotypic variability in membrane thermos-stability in groundnut. **Indian Journal of Plant Physiology**, v.7, p.97-102, 2002.

TAYLOR, S.H.; HULME, S.P.; REES, M.; RIPLEY, B.S.; WOODWARD, F.I.; OSBORNE, C.P. Eco-physiological traits in C3 and C4 grasses: a phylogenetically controlled screening experiment. **New Phytologist**, v.185, p.780–791, 2010.

TEIXEIRA, F.K.; MENEZES-BENAVENTE, L.; GALVAO, V.C.; MARGIS, R.; MARGIS-PINHEIRO, M. Rice ascorbate peroxidase gene family encodes functionally diverse isoforms localized in different subcellular compartments. **Planta**, v.224, p.300–314, 2006.

TEIXEIRA, F.K.; MENEZES-BENAVENTE, L.; MARGIS, R.; MARGIS-PINHEIRO, M. Analysis of the molecular evolutionary history of the ascorbate peroxidase gene family: inferences from the rice genome. **Journal of Molecular Evolution**, v.59, p.761–770, 2004.

TESKEY, R.; WERTIN, T.; BAUWERAERTS, I.; AMEYE, M.; MCGUIRE, M.A.; STEPPE, K. Responses of tree species to heat waves and extreme heat events. **Plant, Cell and Environment**, v.38, p.1699–1712, 2015.

THELLIN, O.; LAKAYE, B.; DE BORMAN, B.; COUMANS, B.; HENNE, G.; GRISAR, T.; IGOUT, A.; HEINEN, E. Housekeeping genes as internal standards: use and limits. **Journal of Biotechnology**, v.75, p.197–200, 1999.

VACHA, F.; ADAMEC, F.; VALENTA, J.; VACHA, M. Spatial location of photosystem pigment–protein complexes in thylakoid membranes of chloroplasts of *Pisum sativum* studied by chlorophyll fluorescence. **Journal of Luminescence**, v.123, p.301–303, 2007.

VALVERDE, B.E. Status and management of grass-weed herbicide resistance in Latin America. **Weed Technology**, v.21, p.310–323, 2007.

VAN BREUSEGEM, F.; VRANOVÁ, E.; DAT, J.F.; INZÉ, D. The role of active oxygen species in plant signal transduction. **Plant Science**, v. 161, p. 405–414, 2001.

VASEVA, I.I.; ANDERS, I.; FELLER, U. Identification and expression of different dehydrin subclasses involved in the drought response of *Trifolium repens*. **Journal of Plant Physiology**, v.171, p.213–224, 2014.

VERMA, S.; MISHRA, S.N. Putrescine alleviation of growth in salt stressed *Brassica juncea* by inducing antioxidative defense system. **Journal of Plant Physiology**, v.162, p.669–677, 2005.

VILA-AIUB, M.M.; GUNDEL, P.E.; PRESTON, C. Experimental Methods for Estimation of Plant Fitness Costs Associated with Herbicide-Resistance Genes. **Weed Science**, v.63, p.203–216, 2015.

VILA-AIUB, M.M.; NEVE, P.; STEADMAN, K.J.; POWLES, S.B. Ecological fitness of a multiple herbicide-resistant *Lolium rigidum* population: dynamics of seed germination and seedling emergence of resistant and susceptible phenotypes. **Journal of Applied Ecology**, v.42, p.288–298, 2005.

WAHID, A.; GELANI, S.; ASHRAF, M.; FOOLAD, M. R. Heat tolerance in plants: an overview. **Environmental and Experimental Botany**, v.61, p.199–223, 2007.

WAHL, V.; PONNU, J.; SCHLERETH, A.; ARRIVAUULT, S.; LANGENECKER, T.; FRANKE, A.; FEIL, R.; LUNN, J.E.; STITT, M.; SCHMID, M. Regulation of flowering by trehalose-6-phosphate signaling in *Arabidopsis thaliana*. **Science**, v.339, p.704–707, 2013.

- WALIA, H.; WILSON, C.; CONDAMINE, P.L.; LIU, X.; ISMAIL, A.M.; ZENG, L.; WANAMAKER, S.I.; MANDAL, J.; JIN, X.; CUI, X.; CLOSE, T.J. Comparative transcriptional profiling of two contrasting rice genotypes under salinity stress during the vegetative growth stage. **Plant Physiology**, v.139, p.822–835, 2005.
- WANG, A.; YU, X.; MAO, Y.; LIU, Y.; LIU, G.; LIU, Y.; NIU, X. Overexpression of a small heat-shock-protein gene enhance tolerance to abiotic stresses in rice. **Plant Breeding**, v.134, p.384-393, 2015.
- WANG, F.Z.; WANG, Q.B.; KWON, S.Y.; KWAK, S.S.; SU, W.A. Enhanced drought tolerance of transgenic rice plants expressing a pea manganese superoxide dismutase. **Journal of Plant Physiology**, v.162, p.465–472, 2005.
- WANG, J.H.; GENG, L.H.; ZHANG, C.M. Research on the weak signal detecting technique for crop water stress based on wavelet denoising. **Advanced Materials**, v.424, p.966–970, 2012.
- WANG, W.N.; LU, J.W.; REN, T.; LI, X.K.; SU, W.; LU, M.X. Evaluating regional mean optimal nitrogen rates in combination with indigenous nitrogen supply for rice production. **Field Crops Research**, v.137, p.37–48, 2012.
- WATERS, E.R. The evolution, function, structure, and expression of the plant *sHSPs*. **Journal of Experimental Botany**, v.64, p.391–403, 2013.
- WAY, D.A., OREN, R. Differential responses to changes in growth temperature between trees from different functional groups and biomes: a review and synthesis of data. **Tree Physiology**, v.30, p.669–688, 2010.
- WEHMEYER, N.; VIERLING, E. The expression of small heat shock proteins in seeds responds to discrete developmental signals and suggests a general protective role in desiccation tolerance. **Plant Physiology**, v.122, p.1099–1108, 2000.
- WERNER, J.E., FINKELSTEIN, R.R. *Arabidopsis* mutants with reduced response to NaCl and osmotic stress. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v.34, p.913-922, 1995.
- WHEELER, T.R.; CRAUFURD, P.Q.; ELLIS, R.H.; PORTER, J.R.; VARA-PRASAD, P.V. 2000. Temperature variability and the yield of annual crops. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v.82, p.159–167, 2000.
- WHITELAM, G.; HALLIDAY, K. **Light and Plant Development**; Blackwell: Oxford, UK, 2007. p.291.
- WIDDERICK, M.J.; BELL, K.L.; BOUCHER, L.R.; WALKER, S.R. Control by glyphosate and its alternatives of glyphosate-susceptible and glyphosate-resistant *Echinochloa colona* in the fallow phase of crop rotations in subtropical Australia. **Weed Biology and Management**, v.13, p.89-97, 2013.

WISE, R.R.; OLSON, A.J.; SCHRADER, S.M.; SHARKEY, T.D. Electron transport is the functional limitation of photosynthesis in field-grown Pima cotton plants at high temperature. **Plant, Cell and Environment**, v.27, p.717–724, 2004.

WONG, M.L.; MEDRANO, J.F. Real-time PCR for mRNA quantitation. **BioTechniques**, v.39, p.75-85, 2005.

XIAOYING, Z.; XUHONG, Y.; ELOISE, F.; GREGORY, M.S.; JAVIER, L.; BENDEHAKKALU, K.T.; JING, X.; JAMES, L.W.; XUANMING, L.; JAMES, B.R.; CHENTAO, L. A study of gibberellin homeostasis and cryptochrome-mediated blue light inhibition of hypocotyl elongation. **Plant Physiology**, v.145, p.106- 118, 2007.

XIE G.; XIAO, P.; CHEN, D.; XU, L.; ZHANG, B. miRDeepFinder: a miRNA analysis tool for deep sequencing of plant small RNAs. **Plant Molecular Biology**, v.80, p.77-84, 2012.

XU, J.; DUAN, X.G.; YANG, J.; BEECHING, J.R.; ZHANG, P. Enhanced reactive oxygen species scavenging by overproduction of superoxide dismutase and catalase delays postharvest physiological deterioration of cassava storage roots. **Plant Physiology**, v.161, p.1517-1528, 2013.

YABUNO, T. Cytotaxonomic studies on the two-cultivated species and the wild relatives in the genus *Echinochloa*. **Cytologia** v.27, p.296-305, 1962.

YAMADA, K.; FUKAO, Y.; HAYASHI, M.; FUKAZAWA, M.; SUZUKI, I.; NISHIMURA, M. Cytosolic *HSP90* regulates the heat shock response that is responsible for heat acclimation in *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Biological Chemistry**, v.282, p.37794–37804, 2007.

YAN, X.; DONG, X.; ZHANG, W.; YIN, H.; XIAO, H.; CHEN, P.; MA, X.F. Reference gene selection for quantitative real-time PCR normalization in *Reaumuria soongorica*. **Plos one**, v.9, p.-, 2014.

YANG, P.M.; HUANG, Q.C.; QIN, G.Y. Different drought-stress responses in photosynthesis and reactive oxygen metabolism between autotetraploid and diploid rice. **Photosynthetica**, v.52, p.193–202, 2014.

YANG, X.; ZHANG, Z.; GU, T.; DONG, M.; PENG, Q.; BAI, L.; LI, Y. Quantitative proteomics reveals ecological fitness cost of multi-herbicide resistant barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli* L.). **Journal of Proteomics**. v.150, p.160-169, 2017.

YASOUR, H.; OSUNA, M.D.; ORTIZ, A.; SALDAÍN, N.E.; ECKERT, J.W.; FISCHER, A.J. Mechanism of resistance to penoxsulam in late watergrass [*Echinochloa phyllopogon* (Stapf) Koss.]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.57, p.3653-3660, 2009.

YE S.F.; YU, S.W.; SHU, L.B.; WU, J.H.; WU, A.Z.; LUO, L.J. Expression profile analysis of 9 heat shock protein genes throughout the life cycle and under abiotic stress in rice. **Chinese Science Bulletin**, v.57, p.336-346, 2012.

- YILDIZ, M.; TERZI, H. Small heat shock protein responses in leaf tissues of wheat cultivars with different heat susceptibility. **Biologia**, v.63, p.521-525, 2008.
- YOON, M.; PUTTERILL, J.J.; ROSS, G.S.; LAINGW, A. Determination of the relative expression levels of Rubisco small subunit genes in Arabidopsis by rapid amplification of cDNA ends. **Analytical Biochemistry**, v.291, p.237-244, 2001.
- YOSHIDA, S. Fundamentals of rice crop science. Los Baños: IRRI, 1981. 269p.
- YOSHIMURA, K.; YABUTA, Y.; ISHIKAWA, T.; SHIGEOKA, S. Expression of spinach ascorbate peroxidase isoenzymes in response to oxidative stresses. **Plant Physiology**, v.123, p.223-234, 2000.
- YUN, M.S.; YOGO, Y.; MIURA, R.; YAMASUE, Y.; FISCHER, A.J. Cytochrome P-450 monooxygenase activity in herbicide-resistant and susceptible late watergrass (*Echinochloa phyllopogon*). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 83, p. 107-114, 2005.
- ZHANG, J.; HUANG, W.; PAN, Q.; LIU, Y. Improvement of chilling tolerance and accumulation of heat shock proteins in grape berries (*Vitis vinifera* cv. Jingxiu) by heat pretreatment. **Postharvest Biology and Technology**, v.38, p.80-90, 2005.
- ZHANG, J.J.; LU, Y.C.; ZHANG, J.J. Accumulation and toxicological response of atrazine in rice crops. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.102, p.105-112, 2014.
- ZHANG, J.X.; WANG, C.; YANG, C.Y.; WANG, J.Y.; CHEN, L.; BAO, X.M.; ZHAO, H.; ZHANG, H.; LIU, J. The role of *Arabidopsis* AtFes1A in cytosolic Hsp70 stability and abiotic stress tolerance. **The Plant Journal**, v.62, p.539-548, 2010.
- ZHANG, Z.; HU, J. Development and validation of endogenous reference genes for expression profiling of Medaka (*Oryzias latipes*) exposed to endocrine disrupting chemicals by quantitative real-time RT-PCR. **Toxicology Science**, v.95, p.356-368, 2009.
- ZISKA, L.; BUNCE, J. Predicting the impact of changing CO₂ on crop yields: Some thoughts on food. **New Phytologist**, v.175, p.607-618, 2007.
- ZISKA, L.; McCLUNG, A. Differential response of cultivated and weedy (red) rice to recent and projected increases in atmospheric carbon dioxide. **Agronomy Journal**, v.100, n.5, p.1259-1263, 2008.
- ZISKA, L.H.; GEALY, D.R.; BURGOS, N.; CAICEDO, A.L.; GRESSEL, J.; LAWTON-RAUH, A.L.; ÁVILA, L.A.; THEISEN, G.; NORSWORTHY, J.; FERRERO, A.; VIDOTTO, F.; JOHNSON, D.E.; FERREIRA, F.G.; MARCHESAN, E.; MENEZES, V.; COHN, M.A.; LINScombe, S.; CARMONA, L. TANG, R. MEROTTO, A. Weedy (Red) rice: Na emerging constraint to global rice production. **Advances in Agronomy**, v.129, p.1-48, 2015.

VITA

Claudia de Oliveita é filha de José Dearali de Oliveira e Sonia Mariza de Oliveira. Nasceu em 04 de fevereiro de 1986, no Município de Pinheiro Machado, Rio Grande do Sul. Formou-se pelo Centro Federal de Educação Tecnológica de Pelotas no ano de 2005. No ano de 200 ingressou na Faculdade de Agronomia “Eliseu Maciel” (FAEM) da Universidade Federal de Pelotas (UFPel), onde se graduou como Engenheira Agrônoma em 2011. No período de 2006 a 2010 desenvolveu atividades como estagiário no Centro de Herbologia da UFPel. Em 2013, concluiu o curso de mestrado no Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade da FAEM, UFPel, em Capão do Leão/RS, sob orientação do Prof. Dr. Dirceu Agostinetto, tendo ingressado no mesmo ano no curso de doutorado, na mesma instituição.