

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS À TOLERÂNCIA À SUBMERSÃO E
REGULAÇÃO DO DEGRANE EM ARROZ DANINHO (*Oryza sativa* L.)

Tiago Edu Kaspar
Mestre em Agronomia/UFSM

Tese apresentada como um dos requisitos
à obtenção do Grau de Doutor em Fitotecnia
Ênfase em Herbologia

Porto Alegre (RS), Brasil
Fevereiro de 2018

CIP - Catalogação na Publicação

Kaspary, Tiago Edu
EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS À TOLERÂNCIA À
SUBMERSÃO E REGULAÇÃO DO DEGRANE EM ARROZ DANINHO
(*Oryza sativa* L.) / Tiago Edu Kaspary. -- 2018.
136 f.
Orientador: Aldo Merotto Junior.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Agronomia, Programa de
Pós-Graduação em Fitotecnia, Porto Alegre, BR-RS, 2018.

1. Arroz daninho. 2. Tolerância à submersão. 3.
Degrane. 4. Caracteres de invasibilidade. I. Merotto
Junior, Aldo, orient. II. Título.

TIAGO EDU KASPARY
Engenheiro Agrônomo - UFSM
Mestre em Agronomia - UFSM

TESE

Submetida como parte dos requisitos
para obtenção do Grau de

DOUTOR EM FITOTECNIA

Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia
Faculdade de Agronomia
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Porto Alegre (RS), Brasil

Aprovado em: 27.02.2018
Pela Banca Examinadora

Homologado em: 19.03.2018
Por

ALDO MEROTTO JÚNIOR
Orientador - PPG Fitotecnia
UFRGS

CHRISTIAN BREDEMEIER
Coordenador do Programa de
Pós-Graduação em Fitotecnia

ROBERTO LUIS WEILER
Departamento de Plantas Forrageiras
e Agrometeorologia-UFRGS

CARLA ANDREA DELATORRE
PPG Fitotecnia-UFRGS

ANDRÉ ANDRES
EMBRAPA Clima Temperado
Pelotas/RS

CARLOS ALBERTO BISSANI
Diretor da Faculdade
de Agronomia

*Aos meus pais,
Milton Luis Kaspary e Idelma F. Durante Kaspary,
pelo apoio incondicional e por acreditar no meu sucesso.*

DEDICO...

“Não é o mais forte da espécie que sobrevive, nem o mais inteligente.

É o que melhor se adapta às mudanças”

(Charles Darwin)

AGRADECIMENTOS

A Deus pela oportunidade da existência e por me conduzir nas melhores escolhas.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul e ao Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, pela oportunidade de realização do Doutorado. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsas e apoio financeiro concedidos, durante o período de Doutorado e Doutorado Sanduíche no Exterior.

Em especial aos meus pais, Milton Luís Kasparly e Idelma Fátima Duranti Kasparly, ao irmão Tairon Eugênio Kasparly, ao avô Aloysio F. Kasparly e a avó Ely F. Kasparly (*in memoriam*), pelo apoio, amor, compreensão e pela ajuda na realização dos meus sonhos.

Ao professor Aldo Merotto Jr, orientador, amigo e figura fundamental para realização dessa tese. Pelas brilhantes orientações, incentivos à pesquisa, confiança e amizade estabelecida no decorrer do Doutorado. Aos demais professores do PPG em Fitotecnia por contribuírem na minha formação pessoal e profissional.

Aos colegas do PPG em Fitotecnia, pela amizade, companheirismo, contribuições, convivência e momentos de descontração vivenciados. Em especial, aos amigos Ana Paula, André, Andrew, Alexandre, Catarine, Carlos, Cátia, Carol, Cristiano, Ernandes, Gerarda, Giliardi, Itacir, Luan, Luíza, Marcus, Mateus, Silmara, Yohanna e demais pela amizade e contribuições.

A Dr. Nilda Roma Burgos pela co-orientação durante o período de Doutorado Sanduíche no Exterior na University Of Arkansas, Fayetteville/Arkansas/ Estados Unidos. E aos colegas da mesma universidade, pela troca de experiências e pela amizade.

A minha namorada, Gabriele Casarotto pela confiança, paciência, companheirismo, compreensão, motivação e pelo apoio incondicional ao longo de todas as etapas percorridas.

Enfim, a todos aqueles não citados que contribuíram diretamente e indiretamente para que eu vencesse mais esta importante etapa da minha vida.

A todos vocês, **MUITO OBRIGADO.**

EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS À TOLERÂNCIA À SUBMERSÃO E REGULAÇÃO DO DEGRANE EM ARROZ DANINHO (*Oryza sativa* L.)¹

Autor: Tiago Edu Kaspary
Orientador: Aldo Merotto Jr.

RESUMO

A utilização de lâmina de água é um importante método de controle de arroz daninho na cultura do arroz. O efeito da submersão sobre a germinação e o crescimento inicial do arroz daninho vem diminuindo, o que compromete a eficiência de sistemas de cultivos inundados de arroz. A regulação da tolerância a submersão é parcialmente conhecida apenas em arroz cultivado, mas existe pouco conhecimento em arroz daninho. De forma similar, existe necessidade de avanços no conhecimento sobre o degrane de sementes em arroz cultivado e daninho. Os objetivos desse estudo foram caracterizar a ocorrência e a importância dos principais genes de regulação da tolerância a submersão durante a germinação e o crescimento inicial em arroz daninho e analisar variações na região promotora de gene envolvido com o degrane. A tolerância a submersão foi avaliada pela quantificação da emergência em diferentes lâminas de água e temperaturas e através da análise de expressão relativa de genes relacionados com este estresse. Ainda, foi avaliado a ocorrência de variações nucleotídicas na região promotora do gene *OsXTH8* e procedimentos de cultura de tecidos para arroz daninho. O genótipo ITJ03 foi caracterizado como de elevada tolerância ao alagamento, com emergência superior a 90% nas temperaturas de 25 e 30 °C e sob submersão, enquanto que sob 20 °C não houve emergência. A expressão relativa dos genes *RAmy3D* e *OsTPP7*, responsivos ao alagamento, demonstrou para o genótipo tolerante, incremento respectivo de 30,58 e 46,71 vezes. O genótipo ITJ03 no período de 1 DAS teve a expressão dos genes *ADH2* e *SNRK1* induzida pela submersão em cerca de 63 vezes. A temperatura de 20 °C reduziu a expressão de todos os genes avaliados na parte aérea e radicular. Foi identificada a inserção de uma base “G” ou “C” na posição 289bp *upstream* ao *start códon* do gene *OsXTH8* em todos os genótipos de arroz daninho com elevado degrane. O genótipo AV60 obteve aproximadamente uma planta regenerada por sementes submetida a cultura de tecido. A tolerância ao alagamento durante a germinação e o crescimento inicial em arroz daninho está associada a presença dos genes *RAmy3D*, *OsTPP7*, *ADH2* e *SNRK1*. Baixas temperaturas em conjunto com lâmina de água evitam a emergência do arroz daninho, tornando-se ferramenta no manejo desta planta daninha. A inserção na região promotora do gene *OsXTH8* pode ser correlacionada ao degrane em arroz daninho. O genótipo AV60 pode ser utilizado para cultivo *in vitro* em abordagens biotecnológicas.

¹ Tese de Doutorado em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (136f.) Fevereiro, 2018.

EXPRESSION OF GENES RELATED TO TOLERANCE TO SUBMERSION AND REGULATION OF DEGRANE IN WEEDY RICE (*Oryza sativa* L.)¹

Author: Tiago Edu Kaspary
Adviser: Aldo Merotto Jr.

ABSTRACT

Flooding is an important method of weedy rice control in cultivated rice. The reduction of the flooding effect on germination and initial growth of weedy rice has been observed, which compromise the efficiency of flooded rice systems. The regulation of flooding tolerance is only partially known in cultured rice and poorly understood in weedy rice. Similarly, it is necessary advances in the knowledge about seed shattering in cultivated and weedy rice. The objectives of this study were to characterize the occurrence and importance of the major genes for flooding tolerance during germination and initial growth in weedy rice and to analyze variations in the promoter region of a gene involved with seed shattering. Flooding tolerance was assessed by quantifying the emergence on different flooding depths and temperature and by analyzing relative expression of genes related with this stress. It was evaluated the occurrence of nucleotide variations in the promoter region of the *OsXTH8* gene and tissue culture procedures for weedy rice. The ITJ03 genotype was characterized as high tolerant to flooding, with emergence higher than 90% at temperatures of 25 and 30 °C and under submersion, while under 20 °C there was no emergence. Relative expression of *RAmy3D* and *OsTPP7* genes, responsive to flooding, showed an increase of 30.58 and 46.71 times, respectively, at the four days after sowing (DAS) for the tolerant genotype. The ITJ03 genotype in one DAS had the expression of *ADH2* and *SNRK1* genes induced by flooding about 63 times. The temperature of 20 °C reduced the expression of all the evaluated genes in the shoots and roots. The insertion of a "G" or "C" base at position 289bp upstream to the codon start of the *OsXTH8* gene was identified in all genotypes of high seed shattering, while the AV60 genotype obtained approximately one regenerated plant per seed submitted to tissue culture. The tolerance to flooding during germination and initial growth in weedy rice is associated with the expression of *RAmy3D*, *OsTPP7*, *ADH2* and *SNRK1* genes. Low temperatures together with flooding depths prevent the emergence of weedy rice, becoming a tool in the management of this weed. An insertion into the promoter region of the *OsXTH8* gene can be correlated to shattering seeds in weedy rice. The AV60 genotype can be used for to vitro culture in biotechnological approaches.

² Doctoral thesis in Plant Science, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (136p.) February, 2018.

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Objetivo geral	4
1.2 Objetivos específicos	5
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	6
2.1 Introduction.....	6
2.3 Mechanisms of tolerance to flooding in weeds	10
2.3.1 Tolerance to flooding during germination	10
2.3.2 Tolerance to flooding during seedling emergence.....	13
2.3.3 Tolerance to flooding during the vegetative stage.....	15
2.4 Biotechnological approaches for snorkelling weeds	19
2.4.1 <i>TAC-TIQUES</i> Strategy.....	19
2.4.2 RNAi Strategy.....	21
2.5 Conclusions.....	21
2.6 References.....	22
3 CAPÍTULO I - Tolerância à submersão durante a germinação e o crescimento inicial em arroz daninho	28
3.1 Introdução	31
3.2 Materiais e métodos	33
3.2.1 I - Determinação de método diagnóstico para tolerância de arroz daninho à submersão durante a germinação e o crescimento inicial.....	34
3.2.2 II - Avaliação de genótipos de arroz daninho quanto a tolerância à submersão	34
3.2.3 III - Efeito da temperatura sobre a tolerância à submersão em arroz daninho	36
3.2.4 IV - Influência da pálea e lema e da profundidade do solo na tolerância ao alagamento em arroz daninho	36
3.3 Resultados e discussão.....	37
3.3.1 I - Determinação de método diagnóstico para tolerância de arroz daninho à submersão durante a germinação e o crescimento inicial.....	37
3.3.2 II - Avaliação de genótipos de arroz daninho quanto a tolerância à submersão	41
3.3.3 III - Efeito da temperatura sobre a tolerância à submersão em arroz daninho	

	Página
.....	45
3.3.4 IV - Influência da pálea e lema e da profundidade do solo na tolerância ao alagamento em arroz daninho	49
3.5 Conclusões	55
3.6 Referências.....	56
4 CAPÍTULO II - Expressão de genes relacionados a tolerância à submersão durante a emergência e o crescimento inicial em arroz daninho	59
4.1 Introdução	62
4.2 Materiais e metodos	64
4.2.1 I - Identificação e expressão de genes relacionados à tolerância à submersão durante a germinação e crescimento inicial de arroz daninho	64
4.2.2 II – Efeito da temperatura sobre a expressão de genes relacionados a tolerância à submersão em arroz daninho	68
4.3 Resultado e discussão	69
4.3.1 I - Identificação e expressão de genes relacionados à tolerância à submersão durante a germinação e o crescimento inicial de arroz daninho	69
4.3.1.1 <i>Análise de estabilidade de genes referência</i>	69
4.3.1.2 <i>Análise de expressão de genes relacionados com a mobilização de reservas durante a germinação e o crescimento inicial</i>	71
4.3.1.3 <i>Análise de expressão de genes envolvidos na respiração anaeróbica</i>	77
4.3.1.4 <i>Análise de expressão de gene envolvido com a estratégia de quiescência</i>	83
4.3.1.5 <i>Análise de expressão de gene envolvido com a estratégia de escape</i>	85
4.3.2 II – Efeito da temperatura sobre a expressão de genes relacionados a tolerância à submersão em arroz daninho	87
4.3.2.2 <i>Análise de expressão de gene envolvido com a mobilização de reservas</i>	89
4.3.2.3 <i>Análise de expressão de gene envolvido com a respiração anaeróbica</i>	92
4.3.2.4. <i>Análise de expressão de gene envolvido com a estratégia de escape</i>	94
4.4 Conclusões	97
4.5 Referências.....	98
5 CAPÍTULO III - Caracterização da região promotora de gene <i>OsXTH8</i> e cultura de tecido em arroz daninho.....	101
5.1 Introdução	104
5.2 Material e métodos.....	106
5.2.1 Sequenciamento da região promotora do gene <i>OsXTH8</i>	106
5.2.2 Cultura de tecido em arroz daninho	109
5.3 RESULTADOS E DICUSSÃO	111
5.3.1 Sequenciamento da região promotora do gene <i>OsXTH8</i>	111
5.3.2 Cultura de tecido em arroz daninho	113
5.4 Conclusões	116

5.5 Referências.....	117
6 CONCLUSÕES GERAIS.....	119

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

1. Genótipos de arroz utilizados para o estudo de investigação da tolerância ao alagamento na germinação e o crescimento inicial de arroz daninho. Faculdade de Agronomia – UFRGS, Porto Alegre, 2015.35
2. Emergência (%) de genótipos de arroz daninho submetidos a diferentes alturas de lâmina de água. UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil, 2015.....43
3. Emergência (%) de genótipos de arroz em diferentes temperaturas e condições de alagamento aos 07, 14, 21 e 28 dias após a semeadura (DAS). UFRGS, Porto Alegre – RS, 2017.....46
4. Comprimento de parte aérea (CPA) de genótipos de arroz em diferentes temperaturas e condições de alagamento aos 28 dias após a semeadura (DAS). UFRGS, Porto Alegre – RS, 2017.48

CAPÍTULO II

1. Genes de referência e candidatos à tolerância a submersão, sequência dos primers (5'-3') utilizados para a análise de RT-qPCR e temperatura de pareamento (Tm). UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil. 2018.66

CAPÍTULO III

1. Identificação dos acessos de arroz daninho e cultivares de arroz, espécies e subespécies e origem dos genótipos utilizados no sequenciamento da região promotora do gene *OsXTH8*. University of Arkansas, Fayetteville, USA, 2017.108
2. Identificação dos acessos de arroz daninho e cultivares de arroz, espécies e subespécies e origem dos genótipos utilizados na cultura de tecidos. University of Arkansas, Fayetteville, USA, 2017.....109
3. Meios de cultura de tecidos: Indução de calos (2N6D); Regeneração; Indução de raízes (MS/2) e Vitamina (N6 Vitamina). University of Arkansas, Fayetteville, USA, 2017.....110
4. Número de calos obtidos, plantas regeneradas e altura de plantas de diferentes genótipos de arroz submetidos a cultura de tecido. University of Arkansas, Fayetteville, USA, 2017.....114

LISTA DE FIGURAS

Página

REVISÃO DE LITERATURA

1. Scheme illustrating the main genes involved in tolerance to flooding at different stages of development and advantages conferred on weeds. UFRGS, December 2017. *RAmy3D* (Rice α -Amylases); *SUS3* (Sucrose Synthase 3); *OsTPP7* (Trehalose-6-Phosphate Phosphatase); *LDH* (Lactate Dehydrogenase); *ALDH* (Aldehyde Dehydrogenase); *ADH* (Alcohol Dehydrogenase); *PDC* (Pyruvate Decarboxylase); *OsB12D1* (named *OsB12D1*); *NShB1* (Non-Symbiotic hemoglobins-B); *TUB1A* (Tubulin α -1chain); *ADF4* (Actin Factor 4); *XETP* (Xyloglucan Endotransglicosylase); *SK1* (Snorkel1) *SK2* (Snorkel2); *SUB1A* (Submergence-1). 12

CAPÍTULO I

1. Concentração de oxigênio (mg L^{-1}) presente na lâmina de água logo acima do solo (A) e em 0,5 cm de profundidade (B) em função das diferentes alturas de lâmina de água. Os gráficos foram plotados com a média de quatro repetições e as barras verticais indicam o intervalo de confiança ($\alpha = 0,05$). UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil. 2015. 38
2. Emergência (A), estatura (B) e matéria seca (C) de genótipos de arroz irrigado e genótipos de arroz daninho submetidos a diferentes alturas de lâmina de água 21 dias após a semeadura (DAS). Os gráficos foram plotados com a média de quatro repetições e as barras verticais indicam o intervalo de confiança ($\alpha = 0,05$) UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil. 2015. 40
3. Emergência aos sete (A, C e F) e 14 (B, D e G) dias após a semeadura (DAS) em genótipos de arroz submetidos a diferentes lâminas de água e profundidade de semeadura. Os gráficos foram plotados com a média de quatro repetições e as barras verticais indicam o intervalo de confiança ($\alpha = 0,05$) UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil, 2017. 51
4. Emergência (A, C e F) e matéria seca da parte aérea (B, D e G) em genótipos de arroz submetidos a diferentes lâminas de água e profundidade de semeadura, avaliado aos 21 dias após a semeadura. Os gráficos foram plotados com a média de quatro repetições e as barras verticais indicam o intervalo de confiança ($\alpha = 0,05$) UFRGS, Porto Alegre, 2017. 53

CAPÍTULO II -

1. Valores de Ct (A) e Coeficiente de estabilidade obtidos a partir dos programas computacionais Delta Ct (B), BestKeeper (C), NormFinder (D) e geNorm (E) e RefFinder (F) para quatro genes referência para arroz e arroz daninho (*Oryza sativa* L.) submetidos a submersão durante a germinação e o crescimento inicial. Quanto menor o valor do coeficiente, maior a estabilidade do gene. UFRGS, Porto Alegre - RS, Brasil. 2018.70
2. Expressão relativa do gene *Rice α -Amylase 3D - RAm3D*, em genótipos de arroz (*Oryza sativa* L.), sensíveis – cultivar IRGA 417 e Nipponbare (A e D); tolerante – arroz daninho ITJ03 (B); e mediamente tolerante – arroz daninho AV04 (C) nas situações de solo alagado (lâmina de 10 cm) e úmido (controle) nos períodos de 0; 0,5; 1; 2; 4; 8; 16 e 24 dias após a semeadura. Barras verticais indicam o intervalo de confiança ($\alpha=0,05$). UFRGS, Porto Alegre - RS, Brasil, 2018.73
3. Expressão relativa do gene *Sucrose Synthase 3 – SUS3*, em genótipos de arroz (*Oryza sativa* L.), sensíveis – cultivar IRGA 417 e Nipponbare (A e D); tolerante – arroz daninho ITJ03 (B); e mediamente tolerante – arroz daninho AV04 (C) nas situações de solo alagado (lâmina de 10 cm) e úmido (controle) nos períodos de 0; 0,5; 1; 2; 4; 8; 16 e 24 dias após a semeadura. Barras verticais indicam o intervalo de confiança ($\alpha=0,05$). UFRGS, Porto Alegre - RS, Brasil, 2018.75
4. Expressão relativa do gene *Trehalose-6-Phosphate Phosphatase 7- OsTPP7*, em genótipos de arroz (*Oryza sativa* L.), sensíveis – cultivar IRGA 417 e Nipponbare (A e D); tolerante – arroz daninho ITJ03 (B); e mediamente tolerante – arroz daninho AV04 (C) nas situações de solo alagado (lâmina de 10 cm) e úmido (controle) nos períodos de 0; 0,5; 1; 2; 4; 8; 16 e 24 dias após a semeadura. Barras verticais indicam o intervalo de confiança ($\alpha=0,05$). UFRGS, Porto Alegre - RS, Brasil, 2018.77
5. Expressão relativa do gene *Pyruvate Decarboxylase 1 -PDC1*, em genótipos de arroz (*Oryza sativa* L.), sensíveis – cultivar IRGA 417 e Nipponbare (A e D); tolerante – arroz daninho ITJ03 (B); e mediamente tolerante – arroz daninho AV04 (C) nas situações de solo alagado (lâmina de 10 cm) e úmido (controle) nos períodos de 0; 0,5; 1; 2; 4; 8; 16 e 24 dias após a semeadura. Barras verticais indicam o intervalo de confiança ($\alpha=0,05$). UFRGS, Porto Alegre - RS, Brasil, 2018.79
6. Expressão relativa do gene *Alcohol Dehydrogenase 1 - ADH1*, em genótipos de arroz (*Oryza sativa* L.), sensíveis – cultivar IRGA 417 e Nipponbare (A e D); tolerante – arroz daninho ITJ03 (B); e mediamente tolerante – arroz daninho AV04 (C) nas situações de solo alagado (lâmina de 10 cm) e úmido (controle) nos períodos de 0; 0,5; 1; 2; 4; 8; 16 e 24 dias após a semeadura. Barras verticais indicam o intervalo de confiança ($\alpha=0,05$). UFRGS, Porto Alegre - RS, Brasil, 2018.81
7. Expressão relativa do gene *Alcohol Dehydrogenase 2 – ADH2*, em genótipos de arroz (*Oryza sativa* L.), sensíveis – cultivar IRGA 417 e Nipponbare (A e D); tolerante – arroz daninho ITJ03 (B); e mediamente tolerante – arroz daninho AV04 (C) nas situações de solo alagado (lâmina de 10 cm) e úmido (controle) nos períodos de 0; 0,5; 1; 2; 4; 8; 16 e 24 dias após a semeadura. Barras verticais indicam o intervalo de confiança ($\alpha=0,05$). UFRGS, Porto Alegre - RS, Brasil, 2018.83

8. Expressão relativa do gene *Submergence 1 - Sub1A*, em genótipos de arroz (*Oryza sativa* L.), sensíveis – cultivar IRGA 417 e Nipponbare (A e D); tolerante – arroz daninho ITJ03 (B); e mediamente tolerante – arroz daninho AV04 (C) nas situações de solo alagado (lâmina de 10 cm) e úmido (controle) nos períodos de 0; 0,5; 1; 2; 4; 8; 16 e 24 dias após a semeadura. Barras verticais indicam o intervalo de confiança ($\alpha=0,05$). UFRGS, Porto Alegre - RS, Brasil, 2018..... 84
9. Expressão relativa do gene *Snorkel 1 - SNRK1*, em genótipos de arroz (*Oryza sativa* L.), sensíveis – cultivar IRGA 417 e Nipponbare (A e D); tolerante – arroz daninho ITJ03 (B); e mediamente tolerante – arroz daninho AV04 (C) nas situações de solo alagado (lâmina de 10 cm) e úmido (controle) nos períodos de 0; 0,5; 1; 2; 4; 8; 16 e 24 dias após a semeadura. Barras verticais indicam o intervalo de confiança ($\alpha=0,05$). UFRGS, Porto Alegre - RS, Brasil, 2018..... 86
10. Valores de Ct (A) e Coeficiente de estabilidade obtidos a partir dos programas computacionais Delta Ct (B), BestKeeper (C), NormFinder (D) e geNorm (E) e RefFinder (F) para quatro genes referência para arroz e arroz daninho (*Oryza sativa* L.) submetidos a submersão e diferentes temperaturas durante a germinação e o crescimento inicial. Quanto menor o valor do coeficiente, maior a estabilidade do gene. UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil. 2018. 88
11. Expressão relativa do gene *Rice α -Amylase 3D - RAmy3D*, em genótipos de arroz (*Oryza sativa* L.), sensíveis – cultivar IRGA 417 e Nipponbare (A e D); tolerante – arroz daninho ITJ03 (B); e mediamente tolerante – arroz daninho AV04 (C) nas situações de solo alagado (lâmina de 10 cm) e úmido (controle), sob e diferentes temperaturas (20, 25 e 30 °C) aos 14 dias após a semeadura. Barras verticais indicam o intervalo de confiança ($\alpha=0,05$). UFRGS, Porto Alegre - RS, Brasil, 2018..... 90
12. Expressão relativa do gene *Alcohol Dehydrogenase 2 – ADH2*, e m genótipos de arroz (*Oryza sativa* L.), sensíveis – cultivar IRGA 417 e Nipponbare (A e D); tolerante – arroz daninho ITJ03 (B); e mediamente tolerante – arroz daninho AV04 (C) nas situações de solo alagado (lâmina de 10 cm) e úmido (controle), sob e diferentes temperaturas (20, 25 e 30 °C) aos 14 dias após a semeadura. Barras verticais indicam o intervalo de confiança ($\alpha=0,05$). UFRGS, Porto Alegre - RS, Brasil, 2018..... 93
13. Expressão relativa do gene *Snorkel 1 - SNRK1*, em genótipos de arroz (*Oryza sativa* L.), sensíveis – cultivar IRGA 417 e Nipponbare (A e D); tolerante – arroz daninho ITJ03 (B); e mediamente tolerante – arroz daninho AV04 (C) nas situações de solo alagado (lâmina de 10 cm) e úmido (controle), sob e diferentes temperaturas (20, 25 e 30 °C) aos 14 dias após a semeadura. Barras verticais indicam o intervalo de confiança ($\alpha=0,05$). UFRGS, Porto Alegre - RS, Brasil, 2018..... 95

CAPÍTULO III

1. Alinhamento parcial da sequência referente a região promotora (1.1 kb) do gene *OsXTH8* em 10 genótipos de arroz daninho e quatro cultivares de arroz (Fita senso). University of Arkansas, Fayetteville, USA, 2017..... 112

2. Indução de calos embriogênicos, regeneração de parte aérea, indução de raízes e plantas regeneradas duas semanas após o transplante para os genótipos Nipponbare (A, C, E e G) e AV60 (B, D, F e H). University of Arkansas, Fayetteville, USA, 2017.	115
---	-----

1 INTRODUÇÃO GERAL

O arroz (*Oryza sativa* L.) é cultivado em todos os continentes, apresenta elevada produção sendo considerado um dos alimentos com maior importância para a nutrição humana, possuindo elevada relevância social e econômica. O Brasil é o nono maior produtor mundial com produção aproximada de 12 milhões de toneladas na safra 2016/2017 (SOSBAI, 2017). O sistema de cultivo irrigado, predominante no sul do país, foi utilizado em cerca de 1,4 milhões de ha, atingindo produtividade média de 7618 kg.ha⁻¹ (CONAB, 2017). O Rio Grande do Sul é o principal produtor nacional, sendo responsável por cerca de 70% do montante produzido no Brasil. O cultivo do arroz no sistema irrigado tem como uma das principais limitações a competição com plantas daninhas, entre as quais destaca-se o arroz daninho ou arroz vermelho (*Oryza sativa* L.).

O arroz daninho é a principal planta daninha do arroz cultivado devido a sua proximidade ecológica, elevada adaptabilidade a diferentes práticas agrônômicas, emergência vigorosa e desenvolvimento sincronizado com a cultura, que resultam na dificuldade de seu controle e torna essa espécie daninha presente em praticamente todas as regiões cultivadas com este cereal. Além disso, a presença dos caracteres de invasibilidade como o degrane natural e a dormência de sementes inviabiliza a retirada das sementes da lavoura e facilita reinfestações (Delouche *et al.*, 2007). As perdas médias de rendimento de grãos em função da presença de arroz daninho ficam em torno de 20% e, em áreas com altas infestações, caso não seja realizado o controle adequado, as perdas podem chegar a 90%

(Avila *et al.*, 2000). De forma geral, a presença de uma planta de arroz daninho/m² reduz em 2,1% a produtividade de grãos do arroz cultivado (Balbinot Junior *et al.*, 2003). Os prejuízos causados pela presença do arroz daninho transcendem o campo, pois a maioria de seus genótipos apresentam pericarpo vermelho, contaminando o produto final de arroz, reduzindo o valor de mercado e causando aumento dos custos de beneficiamento (Ghosh *et al.*, 2017).

O controle do arroz daninho, visando minimizar a sua interferência sobre a cultura, pode ser realizado por diferentes métodos. Contudo, a inundação contínua da área, estratégia amplamente utilizada nos sistemas de cultivo de transplante e de sementes pré-germinadas, é a prática mais eficiente no controle dessa espécie daninha, pois o arroz daninho e o cultivado são sensíveis as condições de baixa disponibilidade de oxigênio durante a germinação e o crescimento inicial (Ismail *et al.*, 2009; Angaji *et al.*, 2010). Enquanto isso, o sistema de semeadura no seco também utiliza a inundação como ferramenta de controle do arroz daninho, contudo a formação da lâmina ocorre somente após o estabelecimento da cultura.

A utilização de lâmina de água como ferramenta de manejo de plantas daninhas, ao longo dos anos, tem selecionado genótipos de arroz daninho com capacidade de emergir em condições de inundação do solo, com baixa disponibilidade (hipóxia) ou ausência de oxigênio (anóxia). Os primeiros relatos descrevendo pequena evolução de genótipo de arroz daninho para a capacidade de germinar e emergir sob condições de alagamento foram realizados na China e Índia, mas o mecanismo de tolerância envolvido não é descrito (Chauhan, 2012; Ghosh *et al.*, 2017). Desta forma, a capacidade de tolerar a submersão durante a germinação e o crescimento inicial torna-se uma nova característica de invasibilidade do arroz daninho, que combinada ao degrane e a dormência possibilita a competição com a cultura, multiplicação de sementes, incremento do banco de sementes e reinfestações futuras. Em áreas orizícolas do sul do Brasil cultivadas com sistema pré-germinado já é possível observar a ocorrência de arroz daninho com capacidade de germinar

e emergir na presença contínua de lâmina de água.

O potencial de germinação e o crescimento inicial do arroz sob condições de hipóxia e anóxia é associado a elevada mobilização de reservas e a capacidade diferencial de obtenção de energia via rotas anaeróbicas (Fukao *et al.*, 2006; Ismail *et al.*, 2012). Nesse sentido, genótipos tolerantes são capazes de expressar conjuntos de genes relacionados à aclimatação às condições desfavoráveis (Loreti *et al.*, 2017). Além disso, após a germinação estratégias de “quiescência” e “escape” são descritas como mecanismos de tolerância ao alagamento em arroz cultivado. A quiescência é caracterizada pela paralisação do metabolismo da planta durante a ocorrência do alagamento, enquanto o escape consiste no alongamento dos entrenós do colmo até a planta emergir da lâmina de água (Fukao *et al.*, 2011; Hattori *et al.* 2011). Contudo, para arroz daninho não é relatada a presença de nenhum desses mecanismos de tolerância, bem como a sua interação com outros fatores que influenciam a germinação.

A temperatura é um dos principais fatores que influenciam a atividade enzimática afetando diretamente a germinação e emergência. De forma geral, o aumento da temperatura faz com que a velocidade de emergência de arroz daninho seja mais elevada, enquanto temperaturas abaixo de 20°C reduzem significativamente o seu estabelecimento (Sartori *et al.*, 2014). De forma similar, a tolerância ao alagamento pode ser influenciada pela presença da casca e o posicionamento das sementes no perfil do solo, pois estes fatores interferem na disponibilidade e capacidade de trocas gasosas (Ghosh *et al.*, 2017). Contudo, para arroz daninho os estudos são limitados quanto a identificação da variabilidade de resposta existente ou em relação à similaridade de regulação da tolerância ao alagamento em relação ao arroz cultivado.

O conhecimento sobre a regulação do degrane, principal caractere de perpetuação do arroz daninho em áreas cultivadas com arroz, é mais amplo. Inúmeros estudos descrevem a presença desse caractere a partir da formação da camada de abscisão entre o pedicelo e a

mente. Neste contexto, estudos moleculares indicam que o caractere do degrane é relacionado à presença de vários genes, entre os quais alguns envolvidos na diferenciação da camada de abscisão ou codificando enzimas que promovem a clivagem da parede celular (Thurber *et al.*, 2010, Nunes *et al.*, 2015). Recentemente, a partir de análise de expressão de genes relacionados à síntese/degradação da parede celular foi verificada a importância dos genes *OsXTH8* e *OsCel9D* sobre o caractere de degrane em arroz daninho (Nunes *et al.*, 2014). Contudo, ao investigar possíveis alterações na sequência gênica, nenhuma das mutações conhecidas foi associada ao degrane, indicando a possível existência de mutações em regiões não codificadoras ou na região promotora desse gene (Nunes *et al.*, 2015). A presença de alterações na região promotora desse gene pode alterar sua expressão e impactar sobre o degrane.

Atualmente com o advento da utilização de técnicas de transformação genética na abordagem de caracteres de invasibilidade em plantas daninhas o domínio de técnicas de cultura de tecidos é necessário (Ge *et al.*, 2006; Bevitori, 2015). A indução de calos embriogênicos com alta capacidade de regeneração é essencial para intervenções e investigações biotecnológicas (Bevitori *et al.*, 2014). Para arroz daninho, apesar de pertencer a mesma espécie do arroz cultivado, em função da presença abundante de fenóis e outros elementos do metabolismo secundário, não são conhecidos protocolos eficientes para a cultura de tecidos. Deste modo, não é possível o desenvolvimento de abordagens de mitigação de caracteres de invasibilidade que exijam a transformação gênica.

1.1 Objetivo geral

Investigar e caracterizar a ocorrência de tolerância à submersão durante a germinação e crescimento inicial em arroz daninho (*Oryza sativa* L.), assim como analisar variações na região promotora de um gene envolvido com o degrane de sementes.

1.2 Objetivos específicos

- i. Determinar método diagnóstico e avaliar a ocorrência de tolerância diferencial ao alagamento durante a germinação e o crescimento inicial de genótipos de arroz daninho.
- ii. Investigar o efeito de temperatura, presença e ausência da pálea e lema na semente e da profundidade do solo na tolerância ao alagamento em arroz daninho.
- iii. Analisar a expressão de genes relacionados com a tolerância à submersão durante a germinação e o crescimento inicial de arroz daninho.
- iv. Caracterizar o efeito da temperatura sobre os genes de maior expressão em resposta ao alagamento na germinação e no crescimento inicial de arroz daninho.
- v. Analisar a variabilidade nucleotídica da região promotora do gene *OsXTH8* envolvido com o degrane em arroz daninho.
- vi. Determinar protocolo de obtenção de plantas de arroz daninho a partir de cultura de tecido.

2 REVISÃO DE LITERATURA

ABSTRACT

Flooding is an important strategy for weed control used in the rice crop. However, weeds had evolved mechanisms of tolerance to this anoxic environment, resulting in new ecotypes of ‘snorkelling’ weeds. The objectives of this review are to discuss the main mechanisms of weed tolerance to flooding and the putative biotechnological approaches for their mitigation. Most of the existing knowledge about flooding tolerance was derived from crop models, mainly rice. This knowledge could be used in investigations on flooding tolerance in weedy rice, *Echinochloa* and other weeds. During germination, the gene *RAmy3D* related to carbohydrate mobilization and energy intake, and those involved in metabolism maintenance under anoxia (*ADH*, *PDC* and *OsB12D1*) are the most important for flooding tolerance. Tolerance flooding in emergence, involved response promoted by ethylene and induction of *RAmy3D*, *ADH*, *PDC* and *OsB12D1* genes. During the vegetative development, the presence of aerenchyma enables internal aeration between shoots and roots; hence the survival of partially submerged plants. Other mechanisms present in species tolerant to complete submersion are escape mechanisms or become quiescent during the submergence period. Mitigation of flooding tolerance in weeds is possible with biotechnological approaches and genetic manipulation of flood tolerance genes through RNAi and transposons, providing a potential new tool for weed management.

2.1 Introduction

The occurrence of partial or complete flooding deprives plants in important processes such as respiration and photosynthesis, because the diffusion of oxygen (O₂) is drastically reduced in water. In addition to O₂ deficiency, waterlogging promotes the accumulation of CO₂, methane, ethylene, hydrogen sulfide, and hydrogen thereby reducing aerobic respiration (Pires *et al.*, 2002). Oxygen deficiency paralyzes mitochondrial respiration, leading to insufficient energy production in the form of adenosine triphosphate (ATP) (Zabalza *et al.*, 2009). Evolutionarily, some plant species were selected under conditions of

hypoxia (low availability of oxygen) or anoxia (absence of oxygen) for respiration (Loreti *et al.*, 2016). The evolution occurs by the simple adaptation to the low energy availability generated by flooding, to complex processes related to the lack of O₂ and mitochondrial respiration, stimulating mechanisms to obtain ATP by anaerobic pathways and develop mechanisms of quiescence or escape to flooding (Hsu & Tung, 2017). The interspecific variability to these processes imposes a strong impact on the abundance and distribution of plant species in flooded ecosystems, as well as being the main abiotic factor influencing the distribution of agricultural crops and production variability (Ismail *et al.*, 2012). Flooding induces complex responses that vary depending on the severity and duration of stress, plant growth status, as well as species and cultivars (Wang *et al.*, 2017). Several *Oryza* species are naturally tolerant to flooding, and this characteristic provided opportunities for rice domestication and utilization as one of the main staple food worldwide.

Several recent studies had been developed with soybean, maize and wheat related to the physiological effects of the flooding stress and also for the development of tolerant varieties (Yin *et al.*, 2017; Mano and Omori, 2015; Winkel *et al.*, 2017). Other studies are also available in non-crop species, such as *Echinochloa* sp. and *Cyperus* sp. (Ismail *et al.*, 2012; Estioko *et al.*, 2014). However, most of knowledge about the mechanisms of flooding tolerance was obtained in rice and some weeds associated with this crop. Recently the development of Swarna-Sub1 rice, which tolerates complete submersion for two weeks with regular resumption of growth after the end of stress, has provided the use of fields subject to rapid and deep flooding (Mackill *et al.*, 2012). Flooding tolerance is also present in several weed species, such as *Echinochloa* sp., *Sagittaria* sp., *Heteranthera sessilis*, *Leptochloa chinensis*, *Cyperus* sp., *Potamogeton distinctus*, *Ludwigia* sp., *Ipomoea aquatica* and *Frimbistylis miliaceae* (Estioko *et al.*, 2014; Kraehmer *et al.*, 2016; Tshewang *et al.*, 2016). These weeds have submersion tolerance mechanisms, which could be called snorkelling strategy.

Water is the most efficient cultural method for controlling flood-sensitive weeds soon after rice sowing and characterizes the different rice establishment systems, such as dry-seeding, water-seeding or transplant (Rao *et al.*, 2007). These systems were developed for providing water for the rice crop and also as weed control method. Therefore, although rarely evocated, water is one of the main natural herbicide used in agriculture. However, since rice domestication weeds had co-evoluted with rice and become one of the main problems to rice crop worldwide. Transplanting and water-seed systems are most efficient for weed control than dry-seed, mainly for weedy rice, which is one of the most important constrain of rice production worldwide. Recent reports indicate weedy rice adaptation to flooding is occurring, and this is an important challenge for the utilization of these water establishment systems in rice (Chauhan, 2012). The changes in metabolism and morphological growth processes suggest that these plants more adapted to flooded field conditions (Ismail *et al.*, 2012).

Current advances of biotechnology indicates the possibility of using molecular tools for the understanding of flood tolerance and for the manipulation of DNA and RNA for the development of modern snorkelling weed controls methods (Gressel & Levy, 2014; Shaner & Beckie, 2014). The use of interfering RNA and transposable DNA elements were investigated and tested to mitigate the resistance of weeds to herbicides (Gressel & Levy, 2014). This model propose the introgression of a unfitness gene for a specie through gene flow from the crop to the target weed as an advanced biotechnological tool. In this case, the gene is inactive in the crop and only acts when present in the weed based on recognition of genetic differences in these plants. These approaches can be used to mitigate characters of invasiveness to flooded environments (Gressel & Levy, 2014, Wu *et al.*, 2014), mainly associated with the rice crop and weedy rice as the donor and target species, respectively.

The objectives of this review are to describe the current knowledge about the main mechanisms of weed tolerance to flooded environments and to present possible

biotechnological approaches applied in their mitigation.

2.2 Weeds in flooded crop culture

Water deficit is the main constraint to food availability. Rice, which is cultivated in a flooded environment does not have this limitation, but interference with flood-tolerant weeds is the main biological limitation in flooded rice systems. In the rice paddy, yield losses due to weeds vary from 20 to 60% for transplanted rice and from 30 to 100% for dry-seed rice (Rao *et al.*, 2007). In flooded rice, correct management of water deep is the most efficient tool for management of non-aquatic weeds.

Flooding is effective in controlling weeds such as *Echinochloa colona*, *Fimbristylis miliacea*, *Cyperus iria*, weedy rice and many others and has been used for this purpose since rice domestication (Chauhan & Johnson, 2009). However, to be effective, proper water management is critical. Flood initiation, duration, and water deep affect the emergence, establishment, and growth of plants in flooded fields and result in variable weed control (Chauhan, 2012). For example, flooding during the germination and emergence stages of weeds is more effective in controlling *Echinochloa crus-galli*, *Cyperus difformis*, *F. miliacea* and weedy rice than late flooding (Chauhan & Johnson, 2009). With time, some weed species became tolerant to flooding, making the control of these species through flooding less effective. Fallow periods due to water limitations or farm structure can reduce selection pressure and decreased flooding tolerance evolution in weeds. However, the current intensification of agriculture has resulted in continuous rice cultivation in the same land, resulting in increasing selection for flooding tolerance.

In flooded rice some species increased tolerance to flooding after many years of use of the deep water with weed control method. The first reported case of increased flooding tolerance was performed for *Cyperus rotundus* that evolved to germinated and emerged under deep water conditions on adequacy to anaerobic metabolism of obtaining energy

(Peña-Frontera *et al.*, 2009). Recently, we have also detected weedy rice ecotypes with establishment capacity under submergence conditions, but the mechanisms of tolerance involved are not known (Chauhan, 2012). These studies suggest that with evolution the tolerance to submersion the use of deep water in the management of these weeds is not feasible, implying higher costs in the management and reduction of rice productivity. Therefore, it is necessary to develop alternative management strategies for *Cyperus rotundus* and weedy rice submersion tolerant to reduce the effect on the crop.

2.3 Mechanisms of tolerance to flooding in weeds

2.3.1 Tolerance to flooding during germination

Seed germination constitutes a complex regulatory system. The energy demand during germination is high and numerous exogenous and endogenous factors affect this process mainly associated with oxygen availability (Ray *et al.*, 2016). Germinating seeds normoxia conditions ($O_2 \geq 21\%$) derive energy via electron transport chain and oxidative phosphorylation using the O_2 as final acceptor of electrons. Under anaerobic conditions the electron transport chain and oxidative phosphorylation are inhibited by lack of O_2 and the main source of energy and glycolysis, which is inefficient and prevents germination of most seeds. The way to obtain energy in flooded conditions involves greater mobilization of carbohydrates for glycolysis, activation of anaerobic respiration and lactic or ethanolic fermentation. Differentiated evolution of the metabolism to lack of O_2 allows the germination and emergence of some species in flooding conditions, as *Echinochloa spp.*; *Sagittaria montevidensis*; *S. trifolia* and weedy rice, which are important weeds of rice crop (Liu *et al.*, 2016, Cassol *et al.*, 2008; Chauhan, 2012).

Anaerobic respiration is less efficient than aerobic respiration. In aerobic respiration, a hexose molecule produces up to 39 molecules of ATP, but only three ATP molecules are

generated from the glycolytic steps that occur in anaerobic fermentation (Ismail *et al.*, 2009). Plants tolerant to O₂ deficiency are adapted to the energy crisis generated by the absence of aerobic energy production and started to obtain ATP from the increased catabolism of soluble sugars and starch through glycolysis (Magneschi & Perata, 2009). Since anaerobic respiration is an inefficient process, the seed needs to mobilize a large volume of carbohydrates to obtain the same amount of energy and complete the germination process.

The increased accumulation of energy reserves in the form of non-structural carbohydrates, which serve as a substrate for anaerobic metabolism, has been reported for *Cyperus rotundus* ecotypes tolerant to flooding during germination (Peña-Frontera *et al.*, 2009). Tolerant ecotypes have larger tubers with about twice more non-structural carbohydrates than susceptible plants (Peña-Frontera *et al.*, 2009). However, just producing a greater amount of carbohydrates does not guarantee its rapid mobilization via anaerobic metabolism, it is necessary the rapid conversion of these carbohydrates into glucose which will serve as a substrate for glycolysis, the main source of energy in anaerobic metabolism. Therefore, metabolism adequacy is required for the submersion condition. Under low oxygen availability there is the formation of ethylene which will induce the expression of genes related to carbohydrate conversion and maintenance of anaerobic respiration. Higher expression of the *RAmy3D* gene when seeds were germinated at low oxygen availability was identified in rice cultivars tolerant to hypoxia (Hsu & Tung, 2017). The overexpressing of *RAmy3D* gene in the coleoptile and endosperm of transgenic rice genotypes promoted the increase of germination capacity under anoxic conditions (Wu *et al.*, 2014). This gene is responsible for encoding the alpha-amylase enzyme, which is involved in the mobilization of carbohydrates during germination, and concomitantly the *SUS3* gene promotes the production of soluble sugars in conditions of oxygen deficiency (Fukao *et al.*, 2006). The sugar is then used in the glycolytic pathway to obtain ATP under conditions of oxygen deficiency and, thus, favors the establishment of rice under flooding conditions (Figure 1).

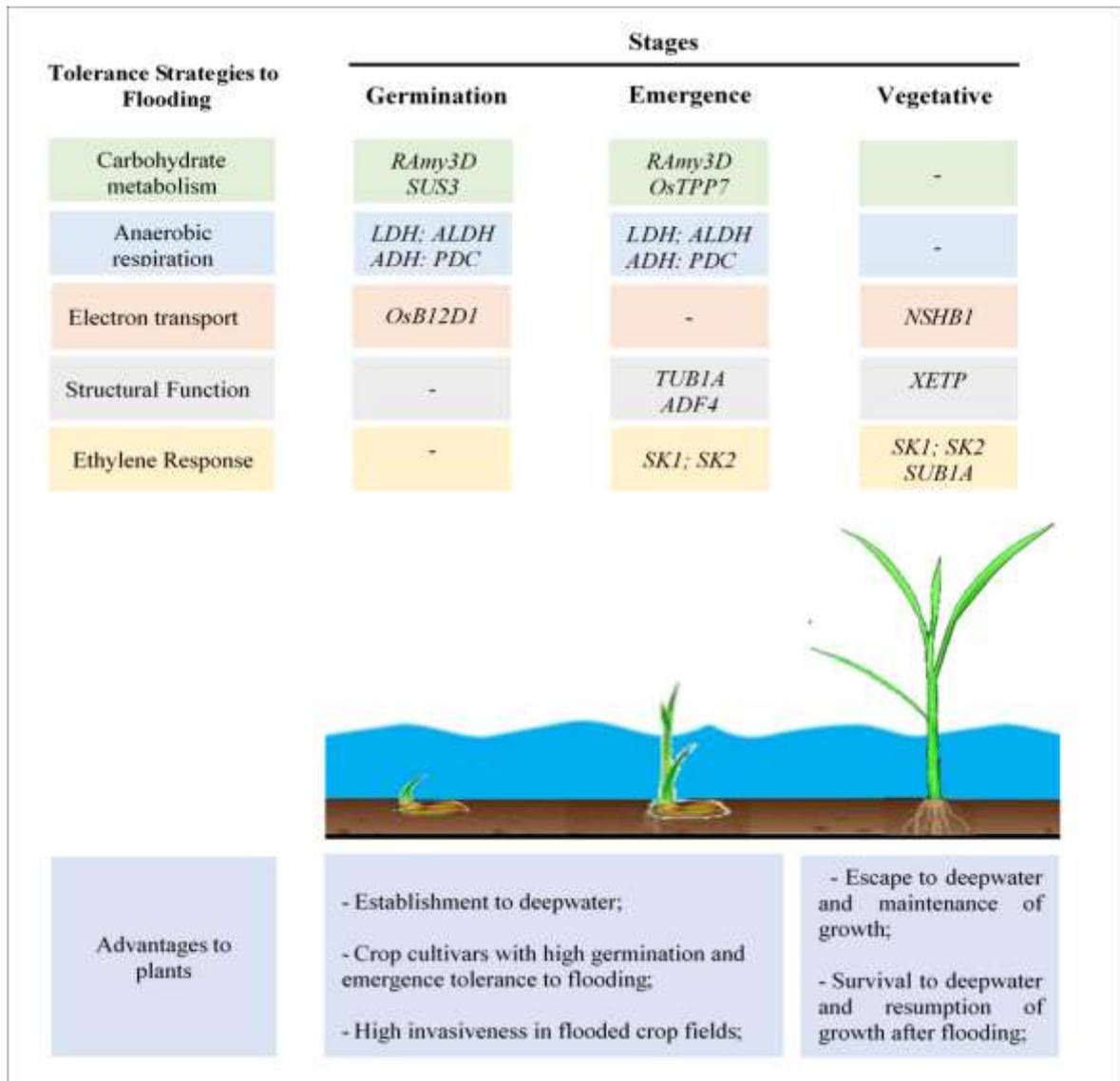


FIGURE 1. Scheme illustrating the main genes involved in tolerance to flooding at different stages of development and advantages conferred on weeds. UFRGS, December 2017. *RAmy3D* (Rice α -amylases); *SUS3* (sucrose synthase 3); *OsTPP7* (trehalose-6-phosphate phosphatase); *LDH* (lactate dehydrogenase); *ALDH* (aldehyde dehydrogenase); *ADH* (alcohol dehydrogenase); *PDC* (pyruvate decarboxylase); *OsB12D1* (named *OsB12D1*); *NSHB1* (non-symbiotic hemoglobins-B); *TUB1A* (tubulin α -1chain); *ADF4* (actin factor 4); *XETP* (xyloglucan endotransglycosylase); *SK1* (Snorkel1) *SK2* (Snorkel2); *SUB1A* (Submergence-1).

The ATP supply for metabolism under anoxic conditions is enabled by the maintenance of the glycolytic pathway that promotes the regeneration of NAD^+ . This process is maintained from the consumption of pyruvate by fermentation, avoiding the accumulation of this by-product of glycolysis and its inhibition for lack of NAD^+ (Rocha *et al.*, 2010). The beginning of lactic acid fermentation occurs with the production of lactate through the action

of lactate dehydrogenase (LDH), which acidifies the cytoplasm and activates alcoholic fermentation by the action of pyruvate decarboxylase (PDC) and alcohol dehydrogenase (ADH), using pyruvate to produce ethanol (Magneschi & Perata, 2009). These reactions are maintained through the oxidation of NADH in the mitochondrial matrix, accumulating ethanol as by-product. In this process, NADH and oxaloacetate are reduced and reverse Krebs cycle reaction is catalyzed by malate dehydrogenase, regenerating NAD⁺. Thus, NAD⁺ again serves as an electron acceptor in glycolysis, thereby maintaining the production of ATP (Rocha *et al.*, 2010).

Alcohol dehydrogenase, aldehyde dehydrogenase (ALDH) and PDC enzymes are important for the maintenance of anaerobic metabolism in *E. crus-galli* and rice during germination (Figure 1). *Echinochloa crus-galli* and cultivated rice tolerant to flooding have higher activity of ADH, ALDH and PDC than susceptible genotypes (Estioko *et al.*, 2014; Hsu & Tung, 2017). In a complementary or alternative process, the overexpression of the *OsB12D1* allowed germination and emergence the rice under anoxic conditions. This gene encodes an enzyme related to the increase of electron transport in the mitochondria through Fe mediation, allowing ATP to be obtained even under anoxic conditions (He *et al.*, 2014). Although not reported in weedy rice, it is possible that this mechanism is involved in weedy rice tolerance to flooding during germination and initial establishment.

2.3.2 Tolerance to flooding during seedling emergence

After germination, the coleoptile has to elongate to reach the surface of the water to obtain oxygen for aerobic oxidative phosphorylation (Herzog & Pedersen, 2014). Therefore, the emergence requirements have to be supplied quickly, before the seed reserves or vegetative propagules are exhausted under anaerobic respiration (Ismail *et al.*, 2012). This coleoptile elongation constitutes the ‘snorkelling’ strategy for flooding tolerance. Seedling emergence in flooded conditions is facilitated by ethylene-dependent responses (Fukao *et*

al., 2006). In one study under flooded soil, ethylene was not detected in seeds of rice cultivar IR42, not adapted to flooding at germination, but was abundant after germination in seedlings of the flood tolerant genotype KHO (Ismail *et al.*, 2009). The delay in ethylene production suggests that the source of ethylene is probably the embryos that grow under oxygen deficiency, being more related to post-germination growth than the germination *per se* (Ismail *et al.*, 2009).

The germination process and early seedling development produces ethylene which can also promote cell expansion, possibly by downregulating the enzymes involved in increased cell wall stiffness, such as peroxidases, whose activity reduces cell extensibility (Ismail *et al.*, 2012). The presence of ethylene can also increase starch hydrolysis, reduce the synthesis of abscisic acid (ABA), while increasing the synthesis and sensitivity to gibberellins (GA), both of which will enhance the activities of starch catabolizing enzymes, particularly amylases (Fukao *et al.* 2006; Ismail *et al.*, 2012). Ethylene also promotes the elongation of mesocotyl and coleoptile in rice seedlings and high levels of ethylene imply a high increase in growth in flood-tolerant rice genotypes (Ismail *et al.*, 2012). For genotypes susceptible to flooding, the slower emergence and slow growth was correlated with the low ethylene production and high activity of peroxidases under flood stress (Ismail *et al.*, 2012).

Ethylene also acts as a stimulus for the mobilization of seed reserves after germination based on the activation of alpha-amylase enzymes (Fukao *et al.*, 2006; Ismail *et al.*, 2009). Similar to what occurs in germination, high expression of the *RAmy3D* gene is observed in the coleoptile and radicle of rice seedlings under anoxia (Figure 1). The expression of this gene was up to 592 times higher in the tolerant than in the susceptible genotype of rice 8 d after seed imbibition (Lasanthi-Kudahettige *et al.*, 2007). Also associated with anoxia-tolerance in rice was the loci *OssTPP7* (Gene *OsTPP7*), which encodes the enzyme trehalose-6-phosphate, responsible for increasing the conversion of starch to glucose (Kretzschmar *et al.*, 2015). The greater availability of sugar promoted the

elongation of the coleoptile, resulting in its emergence and high tolerance to submersion (Kretschmar *et al.*, 2015; Loreti *et al.*, 2016). Thus, tolerant genotypes of rice are able to maintain seedling root and shoot growth in flooded conditions (Angaji *et al.*, 2010). The tolerance to flooding during emergence of *Echinochloa* spp. was linked to increased activity of LDH, ALDH, ADH and PDC enzymes (Fukao *et al.* 2006; Estioko *et al.*, 2014). The growth of roots and shoots of flood-tolerant *Echinochloa crus-galli* was not affected by flooding with 100 mm of water for 7 d after sowing (Estioko *et al.*, 2014).

Structural proteins and enzymes have also been related to continued coleoptile growth of rice seedlings under anoxic and may be the same factors involved in weed adaptation to flooding during emergence. The action of the tubulin α -1 chain (*TUBA1*) and actin factor 4 (*ADF4*) genes on the rapid elongation of coleoptile under anaerobic conditions was suggested because both were upregulated under anoxia during rice emergence (Sadiq *et al.*, 2011). Tubulins enable cell division and elongation and ADF4 is involved in the regulation of actin assembly (Sádiq *et al.*, 2011). Thus, increased expression of both genes in plants, particularly in weeds, correlates with the superior ability to tolerate flooding during emergence (Figure 1). These findings indicate that there are two mechanisms of flooding tolerance: i) increased mobilization of seed reserves and ii) the ability to maintain root and shoot growth during seedling emergence under flood.

2.3.3 Tolerance to flooding during the vegetative stage

Flooding after the initial plant establishment elicits responses that differ across plant species and dependent on the speed and duration of flooding occurrence (Fukao *et al.*, 2006; Ismail *et al.*, 2013). Stress-tolerant genotypes can react by activating adaptation mechanisms to escape or to withstand flooding until the stress is alleviated by formation of aerenchyma (Shiono *et al.*, 2011). This mechanism of tolerance to flooding after establishment is reported in weeds such as *Echinochloa* spp., *Sagittaria montevidensis*; *S. trifolia*, *Cyperus* spp., and

Rumex palustris (Cassol *et al.*, 2008; Ismail *et al.*, 2012). The presence of aerenchyma in flood-tolerant plants is a snorkelling strategy. Aerenchyma is a plant tissue with high proportion of intercellular spaces. The aerenchyma facilitates the diffusion of gases between the flooded and non-flooded organs of the plant, which allows the aerobic respiration of root cells (Yamauchi *et al.*, 2014). The formation of aerenchyma in plants as a response to flooding is mediated by ethylene, inducing the activity of xyloglucan endotransglycosylase (*XETP* - Figure 1), which induces cell wall degradation. However, for formation of the aerenchyma also requires reactive oxygen species (ROS) and Ca^{2+} (Evans, 2003; Yamauchi *et al.*, 2014). In rice, the use of ethylene or its precursor 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) stimulates the formation of aerenchyma in roots (Colmer *et al.*, 2006).

The presence of aerenchyma alone does not guarantee the diffusion of O_2 up to the tips of the roots, because of radial oxygen loss (ROL). The rate of oxygen diffusion through a large distance in the submerged roots can be maintained by the presence of a constitutive or induced apoplastic barrier that prevents the radial loss of oxygen (Colmer *et al.*, 2006). This barrier is typically composed of a suberized lamella that is formed in the exodermal/hypodermic space, near the tip of the root, and by lignified sclerenchyma/epidermal cells (Voisenek & Bailey-Serres, 2015). In this way, an efficient barrier is created that avoids ROL and increases oxygen delivery to the root tip (Shiono *et al.*, 2011).

The presence of genes encoding non-symbiotic hemoglobins (*NSHB1*) was identified in rice under flood conditions as a complementary mechanism for oxygen delivery to root ends, maintaining cell energy levels under conditions of hypoxia (Parent, *et al.*, 2008; Dordas, 2009) (Figure 1). Hemoglobins react with nitric oxide (NO) produced under conditions of hypoxia, favoring an alternative route of respiration and transport of electrons in the mitochondria of plants under flood conditions. Under hypoxia, *NSHB1* reacts

oxidatively with NO, producing nitrate and stimulating the consumption of NADH, thereby releasing NAD + that can be reused again in glycolysis (Hebelstrup, *et al.*, 2007; Dordas, 2009). These mechanisms acting alone, or concomitantly, certainly occur in flooding-tolerant weeds. However, the specific function in different species is unknown.

In cases of complete submersion of the plant, aerenchyma formation is of crucial importance, but aeration is much more efficient when the aerial part can grow and emerge above the water level (Herzog & Pedersen, 2014). Some plant species growing in flooded environments have evolved the ability to elongate their porous shoots under flood conditions to facilitate the uptake of oxygen from the atmosphere and to transport it to the roots via the aerenchyma. This adaptation has a high energy cost and is restricted to native species in environments characterized by shallow but prolonged flooding (Voeselek & Bailey-Serres, 2015). These flood-adapted plants possess the mechanism described as low O₂ escape syndrome (LOES), which is observed in rice cultivars and *Rumex palustris* growing in the floodplains of the Reno river (Voeselek & Bailey-Serres, 2015).

The submersion escape mechanism is activated by low oxygen concentration and has as promoter to ethylene, gibberellic acid (GA) and auxin, which collectively stimulate underwater growth and stretching (Voeselek & Bailey-Serres, 2015). The modulation of the response to flooding is a function of the *SNORKEL* (SK) locus, responsible for cell elongation under deep water conditions (Hattori *et al.*, 2009) (Figure 1). The SK locus encodes two ethylene-inducible transcription factors, group VII (Ethylene Response Factor (ERF): *SK1* and *SK2* (Sasidharan & Voeselek, 2015). The expression of these genes causes elongation of the rice internodes, even in plants not subjected to flooding stress (Hattori *et al.*, 2009). The signaling effects of *SK1* and *SK2* on the downstream events, which culminates in plant elongation is unclear, but act on GA biosynthesis (Sasidharan & Voeselek, 2015).

The escape response to flooding is beneficial if the plant reaches the surface of the

water before the plant dies. This strategy incurs high energy cost could exhaust the plant's carbon reserves before it can emergence from deep flood (Voeselek & Bailey-Serres, 2015). Thus, some species have evolved another mechanism of flood tolerance based on low O₂ quiescence syndrome (LOQS), identified in local rice cultivars from Asia (Bailey-Serres *et al.*, 2012b). This tolerance mechanism (discovered in rice) is also responsive to ethylene, with the *SUB1* locus encoding two to three ERF-VIIs including *SUB1A*, which regulates metabolism and extends the survival period of plants under complete submersion within two weeks, as well as their recovery and regrowth after the end of the stress (Fukao *et al.*, 2006). Ethylene is accumulated up to saturation level in the plant under flooding, but there is no decrease in ABA concentration nor increase in GA. However, this tolerance mechanism is also present in the weed *Rumex acetosa*, exhibiting metabolic adjustments consistent with energy conservation (Van Veen *et al.*, 2013). In this way, the growth of the petiole and other energy-demanding processes are suppressed, allowing the conservation of resources until the flooding ends (Sasidharan & Voeselek, 2015).

The *SUB1A* represses ethylene biosynthesis thereby inhibiting ethylene-mediated elongation in plants (Fukao *et al.*, 2006) (Figure 1). In addition, *SUB1A* enhances the transcription of *Slender Rice1* and *Slender RiceLike1*, which negatively regulate GA responses and consequently, diminish plant growth (Sasidharan & Voeselek, 2015). The submergence of rice genotypes overexpressing *SUB1A* revealed that the reduction of growth is a result of the lower expression of genes associated with cell elongation, starch metabolism, and induction of fermentation genes (Fukao *et al.*, 2006). The tolerance provided by *SUB1A* is generated by reducing the use of plant reserves in the form of carbohydrates, preventing the energy crisis during submersion (Sasidharan & Voeselek, 2015).

Plants that have not exhausted its carbohydrate reserves at the end of flooding may resume regular development. However, when flooding subsides, the plants will be exposed

to high light and oxygenation, resulting in ROS production and increased lipid peroxidation (Tsai *et al.*, 2014). As a result of the damage to cell membranes, especially of the root, there is a lack of hydraulic conductance, resulting in plant dehydration (Tsai *et al.*, 2014). Therefore, the snorkelling strategy must involve more factors than just plant survival during flooding. It also involves the ability to mitigate subsequent dehydration and oxidative stress, restore photosynthetic activity and resume growth (Sasidharan & Voeselek, 2015). The mechanisms that allow species to be tolerant to submersion, protection and reestablishment of metabolism after flooding are not yet understood. The large diversity of weed species thriving in flooded environments presents an opportunity to discover novel strategies to escape and survive periods of O₂ deficiency. Although, the knowledge about flooding tolerance is still in its infancy, the utilization of some of this information to mitigate the effect of weeds in flood-irrigated crops has been seriously contemplated.

2.4 Biotechnological approaches for snorkelling weeds

2.4.1 TAC-TIQUES Strategy

The strategy *TAC-TIQUES* using multiple copies of transposons mounted on a cassette under the control of an inducible promoter (Pfeifer & Grigliatti, 1996; Gressel & Levy, 2014). Initially proposed for the control of insects and adapted to the mitigation of herbicide resistance in weeds. Many copies of the original transposons are engineered into the target cassette and transferred to the target species, which may be a plant grown as rice, and then released into the field. An introgression of these transposons occurs at multiple loci on different chromosomes, which results in their dispersion across all offsprings (Pfeifer and Grigliatti, 1996). In the management of herbicide resistant plants, the first example of the application was the use of a transposon of susceptibility to an herbicide containing the KEV

gene (Kevorkian [*chemically induced suicide*]) in the crop or directly in the weed. In that sense, a transformation in the crop would be performed using a construct containing a herbicide tolerant gene and a further transposon containing a susceptibility gene to another herbicide. This approach was used to obtain transgenic rice resistant to glyphosate but which presents an RNAi cassette suppressing the expression of the bentazon detoxifying enzyme CYP81A6 leaving the rice susceptible to this herbicide. In this case, when gene flow occurs to weedy rice plants from GM rice, the hybrid weed rice plants can be selectively killed by the spray of bentazon (Liu *et al.*, 2012).

The use of transposons containing modified KEV genes that promote susceptibility to flooding could reverse tolerance to flooding in important weeds, such as weed rice. In a hypothetical application of this approach, insertion into a cultivar of a KEV containing two genes, the first generating resistance to an herbicide and advantageous to culture, and the second gene encoding interfering RNA that acts on the mobilization of carbohydrates during germination in submersion condition. The putative gene to be silenced is *RAmy3D* involved with the mobilization of reserves during germination. This gene is induced under submersion conditions, but under normoxic its expression is low and the same function is performed by other genes of the same family (Lasanthi-Kudahettige *et al.*, 2007). That is, normoxic germination conditions there would be no loss in germination capacity for the transformed cultivated rice. However, upon receiving KEV after natural crosses with the cultivated rice, the weedy rice would be unable to germinate under deep water. In this case, the sowing of the transformed crop would be carried out in a pre-germinated system, not needing to germinate under a deep water, allowing the establishment of the crop and not of the damaged rice. This approach will gradually eliminate the weedy rice from the field since the crossing with the cultivated rice occurs at a rate of 0,03% (Goulart *et al.*, 2016).

2.4.2 RNAi Strategy

RNA interference (RNAi) is a sequence-specific, post-transcriptional gene silencing mechanism, induced by double-stranded RNA (dsRNA). This technology is already used in the mitigation of resistance in weeds and insects. The foliar application of specific ds-RNA in tomato foliar was able to avoid the formation of actin in Colorado potato beetle, promoting its control for 28 days and becoming a new management tool for this insect (Miguel & Scott, 2015). This approach is based on the high specificity of RNAi activity, which would act on specific mRNAs in a target species for which they are developed, not affecting other organisms (Sherman *et al.*, 2015).

From the knowledge of specific differences, from the same mechanism of tolerance to flooding present in the crop and weeds, it would be possible to develop RNAi with specific action on a certain weed. This approach has potential for use in especially with some tolerant weed species, not the possibility of gene flow from important crops, as is the case with *Echinochloa spp.*, *Sagittaria montevidensis*, *S. tripolla* and sedges. In this way, the weed species would cease to be tolerant to flooding while in the crop it will not be altered by gene silencing involved with flooding tolerance (Figure 1). In this context, the control of weeds could then be carried out with the presence of natural or artificial flooding. However, there is still a great lack of knowledge between the theoretical models and the practical applications of this technology, which requires continuous investigations of the mechanism of flooding tolerance in weeds.

2.5 Conclusions

Flooding adaptation is jeopardizing the efficiency of water as one of the most

important non-chemical tool for weed control in flooded irrigated crops. Adapted weeds present one or more mechanisms of tolerance to flooding, which increase their invasiveness in cultivated areas. Several knowledge about flooding tolerance is available in model plants and crops. Nowadays, this knowledge is starting to be used to understand the mechanisms of flooding tolerance in weeds. The mechanisms of carbohydrate mobilization and maintenance of metabolism even under anaerobic conditions are the main strategies of tolerance to flooding during germination, emergence and initial plant establishment. These adaptive responses are mediated especially by the *RAmy3D*, *ADH*, *PDC*, *SUS* and *SNORKEL* genes. In vegetative development, the presence of aerenchyma guarantees the aeration of submerged organs, as well as quiescence and escape strategies mediated by the *SUBIA* and *SNORKEL* genes, respectively, ensuring the presence and perpetuation of weeds in flooded environments.

The use of biotechnology may create a new tool in weed management with the use of transposable elements and RNAi, but knowledge about this technology is limited. Advances in genetic engineering and in the knowledge about the natural flooding tolerance in weeds could result in a new revolution for weed control mainly in the rice crop, similarly to the use of flooding cultivated systems during rice domestication.

2.6 References

ANGAJI, S.A. *et al.* QTLs associated with tolerance of anaerobic conditions during germination in rice (*Oryza sativa* L.). **Euphytica**, Wageningen, v. 172, n. 2, p. 159-168, 2010.

AVILA, L.A.D. *et al.* Banco de sementes de arroz vermelho em sistemas de semeadura de arroz irrigado. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 30, n. 5, p. 773-777, 2000.

BAILEY-SERRES, J. *et al.* Making sense of low oxygen sensing. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 17, n. 3, p. 129-138, 2012b.

BAILEY-SERRES, J.; LEE S.C.; BRINTON, E. Waterproofing crops: effective flooding

survival strategies. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 160, n. 4 p. 1698-1709, 2012a.

BALBINOT JUNIOR, A.A. *et al.* Competitividade de cultivares de arroz irrigado com cultivar simuladora de arroz-vermelho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 1, p. 53-59, 2003.

BEVITORI, R. *et al.* Morpho-anatomical characterization of mature embryo-derived callus of rice (*Oryza sativa* L.) suitable for transformation. **Protoplasma**, Leipzig, v. 251, n. 3, p. 545-554, 2014.

BIVETORI, R. **Avaliação de Cultivares de Arroz (*Oryza sativa* L.) para Cultivo In Vitro**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa, 2015. (Comunicado Técnico, 224).

CASSOL, B.; AGOSTINETTO, D.; MARIATH, J.E.A. Análise morfológica de *Sagittaria montevidensis* desenvolvida em diferentes condições de inundação. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 26, n. 3, p. 487-496, 2008

CHAUHAN, B.S. Weedy rice (*Oryza sativa*) II. Response of weedy rice to seed burial and flooding depth. **Weed Science**, Champaign, Ill., v. 60, n. 3, p. 385-388, 2012.

CHAUHAN, B.S.; JOHNSON, D.E. Ecological studies on *Cyperus difformis*, *Cyperus iria* and *Fimbristylis miliacea*: three troublesome annual sedge weeds of rice. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 155, n. 1, p. 103–112, 2009.

COLMER, T.D.; COX, M.C.; VOESENEK, L.A. Root aeration in rice (*Oryza sativa*): evaluation of oxygen, carbon dioxide, and ethylene as possible regulators of root acclimatizations. **New Phytologist**, London, v. 170, n. 4, p. 767–778, 2006.

CONAB. COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos: Safra 2016/17 - Décimo levantamento**. Brasília: [CONAB], 2017. p. 1-171.

DELOUCHE, J.C. *et al.* **Weedy rices-origin, biology, ecology, and control**. Rome: FAO, 2007. 144 p.

DORDAS, C. Nonsymbiotic hemoglobins and stress tolerance in plants. **Plant Science**, Limerick, v. 176, n. 4, p. 433–440, 2009.

ESTIOKO, P. *et al.* Differences in responses to flooding by germinating seeds of two contrasting rice cultivars and two species of economically important grass weeds. **AoB Plants**, Oxford, n. 6, plu064, 2014.

EVANS, D.E. Aerenchyma formation. **New Phytologist**, Cambridge, v. 161, n. 1, p. 35–49, 2003.

FUKAO, T. *et al.* A variable cluster of ethylene response factor-like genes regulates metabolic and developmental acclimation responses to submergence in rice. **Plant Cell**, Rockville, v. 18, n. 8, p. 2021-2034, 2006.

FUKAO, T.; YEUNG, E.; BAILEY-SERRES, J. *The submergence tolerance regulator SUB1A mediates crosstalk between submergence and drought tolerance in rice*. **Plant**

Cell, Rockville, v. 23, n. 1, p. 412–427, 2011.

GE, X. *et al.* A tissue culture system for different germplasms of indica rice. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 25, n. 5, p. 392-402, 2006.

GHOSH, D. *et al.* Impact of burial and flooding depths on Indian weedy rice. **Crop Protection**, Guildford, v. 100, n. 3, p. 106-110, 2017.

GOULART, I.C.G.R. *et al.* Detecting gene flow from ALS-resistant hybrid and inbred rice to weedy rice using single plant pollen donors. **Experimental Agriculture**, Cambridge, v. 52, n. 2, p. 237-250, 2016.

GRESSEL, J.; LEVY, A. A. Use of multi-copy transposons bearing unfitness genes in weed control: Four example scenarios. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 166, n. 3, p. 1221-123, 2014.

HATTORI, Y. *et al.* The ethylene response factors *SNORKEL1* and *SNORKEL2* allow rice to adapt to deep water. **Nature**, London, v. 460, n. 7258, p. 1026-1031, 2009.

HATTORI, Y.; NAGAI, K.; ASHIKARI, M. Rice growth adapting to deepwater. **Current opinion in plant biology**, London, v. 14, n. 1, p. 100–105, 2011.

HE, D.; ZHANG, H.; YANG, P. The mitochondrion-located protein OsB12D1 enhances flooding tolerance during seed germination and early seedling growth in rice. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 15, n. 8, p. 13461-13481, 2014.

HEBELSTRUP, K.H.; IGAMBERDIEV, A.U.; HILL, R.D. Metabolic effects of hemoglobin gene expression in plants. **Gene**, Amsterdam, n. 398, v. 1-2, p. 86-93, 2007.

HERZOG, M.; PEDERSEN, O. Partial versus complete submergence: snorkelling aids root aeration in *Rumex palustris* but not in *R. acetosa*. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 37, n. 10, p. 2381-2390, 2014.

HSU, S.; TUNG, C. Rna-Seq analysis of diverse rice genotypes to identify the genes controlling coleoptile growth during submerged germination. **Frontiers Plant Science**, Lausanne, v. 8, n. 762, p. 1-15, 2017.

ISMAIL, A.M. *et al.* Mechanisms associated with tolerance to flooding during germination and early seedling growth in rice (*Oryza sativa*). **Annals of Botany**, Oxford, v. 103, n. 2, p. 197–209, 2009.

ISMAIL, A.M. *et al.* The contribution of submergence-tolerant (*Sub1*) rice varieties to food security in flood-prone areas. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 152, n. 1, p. 83-93, 2013.

ISMAIL, A.M. *et al.* Adaptation to flooding during emergence and seedling growth in rice and weeds, and implications for crop establishment. **AoB Plants**, Oxford, v. 2012, pls019, 2012.

KRAEHMER, H. *et al.* Global distribution of rice weeds - A review. **Crop Protection**, Guildford, v. 80, n. 1, p. 73-86, 2016.

KRETZSCHMAR, T. *et al.* A trehalose-6-phosphate phosphatase enhances anaerobic germination tolerance in rice. **Nature Plants**, New York, v. 1, n. 9, p. 1-5, 2015.

LASANTHI-KUDAHETTIGE, R. *et al.* Transcript profiling of the anoxic rice coleoptile. **Plant Physiology**, Rockville, v. 144, n. 1, p. 218–231, 2007.

LIU, B, *et al.* Differential flooding impacts on *Echinochloa caudata* and *Scirpus planiculmis*: implications for weed control in Wetlands. **Wetlands**, Wilmington, v. 36, n. 5, p. 979-984, 2016.

LIU, C. *et al.* A Built-In mechanism to mitigate the spread of insect resistance and herbicide tolerance transgenes into weedy rice populations. **PloS One**, San Francisco, v. 7, n. 2, e31625, 2012.

LIU, Z.; SINGER, S. D. Tapping RNA silencing for transgene containment through the engineering of sterility in plants. In: OLIVER, M.J.; LI, Y. (Ed.). **Plant Gene Containment**. Ames: Wiley, 2013. p. 146–174.

LORETI, E. *et al.* Gene regulation and survival under hypoxia requires starch availability and metabolism. **Plant Physiology**, Rockville, v. 176, n. 2, p. 1286-1298, 2017.

LORETI, E.; VAN, V.H.; PERATA, P. Plant responses to flooding stress. **Current opinion in plant biology**, London, v. 33, n. 1, p. 64–71, 2016.

MACKILL, D.J. *et al.* Development and rapid adoption of submergence-tolerant (Sub1) rice varieties. In: Sparks DL, editor. **Advances in agronomy**, Newark, v. 115, n. 1, p. 299–352, 2012.

MAGNESCHI, L.; PERATA, P. Rice germination and seedling growth in the absence of oxygen. **Annals of Botany**, Oxford, v. 103, n. 2, p. 189–196, 2009.

MANO, Y.; OMORI, F. Flooding tolerance in maize (*Zea mays* subsp.*mays*) F₁ hybrids containing a QTL introgressed from teosinte (*Zea nicaraguensis*). **Euphytica**, Wageningen, v. 205, n. 1, p. 255-267, 2015.

MIGUEL, K.S.; SCOTT, J.G. The next generation of insecticides: dsRNAs stable as a foliar-applied insecticide. **Pest Management Science**, West Sussex, v. 72, n. 4, p. 801-809, 2015.

NUNES, A.L.; DELATORRE, C.A.; MEROTTO, A. Gene expression related to seed shattering and the cell wall in cultivated and weedy rice. **Plant Biology**, Stuttgart, v. 16, n. 5, p. 888–96, 2014.

PARENT, C. *et al.* A novel nonsymbiotic hemoglobin from oak: cellular and tissue specificity of gene expression. **New Phytologist**, London, v. 177, n. 1, p. 142-154, 2008.

NUNES, A.L.; DELATORRE, C.A.; MEROTTO, A. Gene expression related to seed shattering and the cell wall in cultivated and weedy rice. **Plant Biology**, Stuttgart, v. 16, n. 5, p. 888–96, 2014.

- PARENT, C. *et al.* A novel nonsymbiotic hemoglobin from oak: cellular and tissue specificity of gene expression. **New Phytologist**, London, v. 177, n. 1, p. 142-154, 2008.
- PATTERSON, S.E. Cutting loose. Abscission and dehiscence in Arabidopsis. **Plant Physiology**, Rockville, v. 126, n. 2, p. 494-500, 2001.
- RAO, A.N. *et al.* Weed management in direct-seeded rice. **Advances in Agronomy**, Newark, v. 93, n. 1, p. 153-255, 2007.
- RAY, S.; VIJAYAN, J.; SARKAR, R.K. Germination stage oxygen deficiency (GSOD): an emerging stress in the era/ of changing trends in climate and rice cultivation practice. **Frontiers Plant Science**, Lausanne, v. 7, n. 671, 2016.
- ROCHA, M. *et al.* Glycolysis and the tricarboxylic acid cycle are linked by alanine aminotransferase during hypoxia induced by waterlogging of *Lotus japonicus*. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 152, n. 3, p. 1501-1513, 2010.
- SADIQ, I. *et al.* Proteomic identification of differentially expressed proteins in the anoxic rice coleoptile. **Journal Plant Physiology**, Stuttgart, v. 168, n. 18, p. 2234–2243, 2011.
- SARTORI, E. M. S. *et al.* Germinação de arroz irrigado e de biótipos de arroz-vermelho submetidas a diferentes temperaturas. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 45, n. 2, p. 319-326, 2014.
- SASIDHARAN, R.; VOESENEK, A. C. J. Ethylene-Mediated Acclimations to Flooding Stress. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 169, n. 1, p. 3-12, 2015.
- SHANER, D. L.; BECKIE, H. J. The future of weed control and technology. **Pest Management Science**, West Sussex, v. 70, n. 9, p. 1329-1339, 2014.
- SHERMAN, J. H. *et al.* RNAi technologies in agricultural biotechnology: The Toxicology Forum 40th Annual Summer Meeting. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, New York, v. 73, n. 2, p. 671-680, 2015.
- SHIONO, K. *et al.* Contrasting dynamics of radial O₂-loss barrier induction and aerenchyma formation in rice roots of two lengths. **Annals of Botany**, Oxford, v. 107, n. 1, p. 89–99, 2011.
- SOSBAI. **Arroz irrigado: Recomendações Técnicas da Pesquisa para o Sul do Brasil**. Pelotas: SOSBAI, 2016. 200 p.
- THURBER, C.S. *et al.* Molecular evolution of shattering loci in US weedy rice. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 19, n. 16, p. 3271–3284, 2010.
- TSAI, K.J.; CHOU, S.J.; SHIH, M.C. Ethylene plays an essential role in the recovery of Arabidopsis during post-anaerobiosis reoxygenation. **Plant Cell Environ**, Oxford, v. 37, n. 10, p. 2391-2405, 2014.
- TSHEWANG, S. *et al.* Weed management challenges in rice (*Oryza sativa* L.) for food security in Bhutan: A review. **Crop Protection**, Guildford, v. 90, n. 4, p. 117-124, 2016.

VAN, V.H. *et al.* Two *Rumex* species from contrasting hydrological niches regulate flooding tolerance through distinct mechanisms. **Plant Cell**, Rockville, v. 25, n. 11, p. 4691-4707, 2013.

VOESENEK, L.A.C.J.; BAILEY-SERRES, J. *Flood adaptive traits and processes: an overview*. **The New Phytologist**, London, v. 206, n. 1, p. 57–73, 2015.

WINKEL, A. *et al.* Flood tolerance of wheat – the importance of leaf gas films during complete submergence. **Functional Plant Biology**, Collingwood, v. 44, n. 4, p. 888–898, 2017.

WU, S. *et al.* The modified rice α Amy8 promoter confers high level foreign gene expression in a novel hypoxia inducible expression system in transgenic rice seedlings. **Plant molecular biology**, Boston, v. 85, n. 1-2, p. 147-161, 2014.

YAMAUCHI, T. *et al.* Ethylene and reactive oxygen species are involved in root aerenchyma formation and adaptation of wheat seedlings to oxygen-deficient conditions. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 65, n. 1, p. 261-273, 2014.

YIN, X. *et al.* Transcriptomic analysis reveals the flooding tolerant mechanism in flooding tolerant line and abscisic acid treated soybean. **Plant Molecular Biology**, Boston, v. 93, n. 4-5, p. 479–496, 2017.

ZABALZA, A. *et al.* Regulation of respiration and fermentation to control the plant internal oxygen concentration. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 149, n. 2, p. 1087-1098, 2009.

3 CAPÍTULO I

Tolerância à submersão durante a germinação e o crescimento inicial em arroz daninho

TOLERÂNCIA À SUBMERSÃO DURANTE A GERMINAÇÃO E O CRESCIMENTO INICIAL EM ARROZ DANINHO

RESUMO

A contínua utilização de lâmina de água no manejo de arroz daninho pode estar selecionando genótipos com tolerância à submersão durante a germinação e o crescimento inicial, o que compromete seu controle através dos sistemas pré-germinado e transplante. O objetivo deste estudo foi avaliar a tolerância diferencial ao alagamento em genótipos de arroz daninho, e investigar o efeito da temperatura, pálea e lema da semente e da profundidade do solo na tolerância ao alagamento em arroz daninho. Inicialmente foi realizada a determinação de metodologia de avaliação utilizando-se as cultivares Nipponbare e IRGA 417 e os genótipos daninhos AV04 e ITJ03, e sete alturas de lâmina de água (2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 12,5 e 15,0 cm acima do solo e testemunha com solo saturado). Em seguida foram avaliados 160 genótipos de arroz cultivado e arroz daninho em três alturas de lâmina de água (solo saturado, 5,0 e 10 cm). O terceiro experimento constou de três temperaturas (20, 25 e 30 °C), três alturas de lâmina de água (solo saturado, 5,0 e 10 cm) e cinco genótipos de arroz (Cultivares Nipponbare e IRGA 417 e genótipos daninhos AV04, ITJ03 e ITJ01). O efeito da presença ou ausência da pálea e lema, de três alturas de lâmina de água (solo saturado, 5,0 e 10 cm), sete profundidades de semeadura (superfície; 0,25; 0,50; 1,00; 2,00; 4,00 e 8,00 cm) e cinco genótipos de arroz (Nipponbare, IRGA 417, AV04, ITJ03 e ITJ01) foram avaliados no quarto experimento. A utilização de lâminas de água de 5 e 10 cm foi eficiente para discriminar genótipos de arroz daninho de média e elevada tolerância à submersão durante a germinação e o crescimento inicial. A seleção de genótipos de arroz daninho ao alagamento indicou a existência de variabilidade entre os acessos, onde um e 13 genótipos apresentaram alta e média tolerância a submersão, respectivamente. Em condição de 20 °C de temperatura juntamente com a presença de 10 cm lâmina de água, não houve emergência de arroz daninho tolerante à submersão, enquanto que para 25 e 30 °C a emergência do genótipo de arroz daninho tolerante ITJ03 foi superior a 90%. Ainda, quando em profundidades superiores a 2 cm e sob 10 cm de lâmina de água não ocorreu emergência dos diferentes genótipos de arroz, indicando o efeito cumulativo dos dois fatores. Existem genótipos de arroz daninho que demonstram evolução para tolerância à submersão. Lâmina de água de 10 cm quando associada a baixa temperatura e/ou profundidades de solo superior a 2 cm é capaz de evitar a emergência de arroz daninho, tornando-se uma ferramenta no manejo dos genótipos com tolerância à submersão durante o estabelecimento.

TOLERANCE TO FLOODING DURING GERMINATION AND EARLY GROWTH OF WEEDY RICE

ABSTRACT

The continuous use of the flooding in the management of weedy rice may select genotypes for tolerance to submersion during the germination and initial growth. The objectives of this study were establish a methodology for the selection of weed rice populations with potential tolerance to flooding, to evaluate the differential tolerance to the flooding of several genotypes, and to investigate the effect of temperature, presence of palea and lemma and soil depth on tolerance to flooding in weedy rice. Firstly, the development of the screening methodology was carried out using four rice genotypes, Nipponbare and IRGA 417 cultivars and weedy genotypes AV04 and ITJ03, and seven flooding depths (2.5; 5.0; 7.5; 10.0; 12.5 and 15.0cm above the soil and control with saturated soil). After that, 160 genotypes of cultivated rice and weedy rice were evaluated in three flooding depths (saturated soil, 5.0 and 10.0 cm). The third experiment consisted of three temperatures (20, 25 and 30 °C), three flooding depths (saturated soil, 5.0 and 10.0 cm) and five rice genotypes (Cultivars Nipponbare and IRGA 417 and weedy genotypes AV04, ITJ03 and ITJ01). The fourth experiment evaluated the effect of palea and lemma, three flooding depths (saturated soil, 5.0 and 10 cm), seven burial depths (surface, 0.25, 0.5, 1.0, 4.0 and 8.0 cm) and five rice genotypes (Nipponbare, IRGA 417, AV04, ITJ03 and ITJ01). The flooding depths of 5 and 10 cm discriminate medium and high submersion tolerant rice genotypes. The flooding depths selected rice genotypes indicated the existence of variability among the accessions, where one and 13 genotypes are highly and moderately tolerant to submersion, respectively. At temperature of 20 °C and 10 cm of flooding depths the emergence of submersion tolerant rice was totally suppressed, whereas for 25 and 30 °C the emergence of the ITJ03 weedy rice genotype was higher than 90%. The emergence was also suppressed at burial depths of over 2 cm and under 10 cm flooding depths, indicating the cumulative effect of these two factors. There is large variability of weedy rice genotypes to tolerate the flooding effect at germination and initial growth. The flooding depth of 10 cm when associated with low temperature and/or burial depths of more than 2 cm is able to avoid the emergence of weedy rice, becoming a tool in the management of genotypes with submergence tolerance during the initial growth.

3.1 Introdução

O cultivo de arroz irrigado tem como principal espécie daninha o arroz daninho, também denominado de arroz vermelho, pertencente a mesma espécie do arroz cultivado (*Oryza sativa* L.). A elevada capacidade de infestação apresentada por essa espécie daninha é devida em especial à alta adaptação a práticas agrônômicas, ciclo de desenvolvimento sincronizado com a cultura, além de apresentar elevado nível de degrane e dormência de sementes, o que inviabiliza a retirada das sementes da lavoura e facilita reinfestações futuras (Delouche *et al.*, 2007). As perdas médias de rendimento de grãos em função da presença de arroz daninho ficam em torno de 20% e, em áreas com altas infestações, caso não seja realizada o controle adequado, as perdas podem chegar a 90% (Avila *et al.*, 2000). Em média, a presença de uma planta de arroz daninho/m² reduz em 2,1% a produtividade de grãos do arroz cultivado (Balbinot Junior *et al.*, 2003). Além disso, a maioria dos genótipos de arroz daninho apresenta pericarpo vermelho, contaminando o produto final de arroz, reduzindo o valor de mercado e causando aumento dos custos de beneficiamento (Ghosh *et al.*, 2017). Portanto, estratégias de controle eficientes são essenciais para minimizar o efeito dessa planta daninha na cultura o arroz.

O controle do arroz daninho, visando minimizar a sua interferência sobre a cultura, pode ser realizado por diferentes métodos. A utilização contínua de lâmina de água é o mais empregado, em especial nos sistemas de cultivo pré-germinado e transplante, destacando-se como estratégia de grande eficiência para o manejo desta planta daninha (Avila *et al.*, 2000; Chauhan & Johnson, 2009). A eficácia da inundação como método de supressão da germinação do arroz daninho é devida à sementeira do arroz cultivado ser realizada em solo submerso com lâmina de água de 10 a 15 cm (Agostinetto *et al.*, 2001). Esse sistema de cultivo, assim como o de transplante utiliza a inundação da área durante todo o período de

cultivo do arroz, proporcionando a limitação da disponibilidade de oxigênio para a germinação e emergência, evitando estabelecimento de espécies daninhas entre as quais o arroz daninho (Theisen & Andres, 2010). No mesmo sentido, o sistema de cultivo convencional também utiliza a inundação como ferramenta de controle do arroz daninho, contudo a formação da lâmina ocorre somente após o estabelecimento da cultura.

A utilização de lâmina de água como ferramenta de manejo de plantas daninhas ao longo dos anos tem selecionado genótipos de arroz daninho com capacidade de emergir em condições de inundação do solo. Recentes estudos relatam inicial evolução para a tolerância ao alagamento na germinação e o crescimento inicial do arroz daninho proveniente da China e Índia, contudo não descrevem o mecanismo de tolerância envolvido (Chauhan, 2012; Ghosh *et al.*, 2017). Desta forma, a capacidade de estabelecimento em condições de baixa (hipóxia) ou ausência (anóxia) de oxigênio torna-se uma nova característica de invasibilidade do arroz daninho, possibilitando a competição com a cultura, multiplicação de sementes, incremento do banco de sementes e reinfestações futuras. Em áreas orizícolas do sul do Brasil cultivadas com sistema pré-germinado já é possível observar a ocorrência de germinação e o crescimento inicial de arroz daninho mesmo na presença contínua de lâmina de água.

O potencial de germinar e emergir do arroz sob condições de baixa ou nenhuma disponibilidade de oxigênio é associada à elevada mobilização de reservas e à capacidade diferencial de obtenção de energia via rotas anaeróbicas (Fukao *et al.*, 2006; Ismail *et al.*, 2012). A temperatura é um dos principais fatores que influenciam a atividade enzimática afetando diretamente a germinação e o emergência. De forma geral, o aumento da temperatura faz com que a velocidade de emergência de arroz daninho seja mais elevada, enquanto temperaturas abaixo de 20 °C reduzem significativamente sua germinação e emergência (Sartori *et al.*, 2014; Borjas & Leon, 2016). Sementes de arroz sob condições de baixas temperaturas reduzem as taxas metabólicas e, conseqüentemente, a expressão de

enzimas responsáveis pelo início do processo germinativo, em especial as esterases (Mertz *et al.*, 2009). Concomitantemente é relatado o aumento da atividade de enzimas álcool desidrogenases (ADH) atuando na manutenção da respiração e obtenção de energia, resposta similar a apresentada ao alagamento durante a germinação e o crescimento inicial do arroz (Mertz *et al.*, 2009; Ismail *et al.*, 2009).

A tolerância ao alagamento ainda pode ser responsiva à presença da pálea e lema e, ao posicionamento das sementes no perfil do solo, pois estes fatores interferem na disponibilidade e capacidade de trocas gasosas (Chen *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2015; Ghosh *et al.*, 2017). Contudo, para arroz daninho os estudos são limitados na identificação da variabilidade existente ou em relação à similaridade de regulação em relação ao arroz cultivado. Neste contexto, os objetivos deste estudo foram estabelecer metodologia para a seleção de populações de arroz daninho com suspeita de tolerância à submersão, avaliar a tolerância diferencial ao alagamento de diversos genótipos, e investigar o efeito da temperatura, presença ou ausência da pálea e lema e da profundidade do solo na tolerância ao alagamento em arroz daninho.

3.2 Materiais e métodos

O presente trabalho foi dividido em quatro estudos: Estudo I – Determinação de método diagnóstico para a tolerância de arroz daninho à submersão durante a germinação e o crescimento inicial; Estudo II – Avaliação de genótipos de arroz daninho quanto a tolerância à submersão; Estudo III - Efeito da temperatura sobre a tolerância à submersão em arroz daninho; IV - Influência da pálea e lema e da profundidade da semente solo na tolerância ao alagamento em arroz daninho.

3.2.1 I - Determinação de método diagnóstico para tolerância de arroz

daninho à submersão durante a germinação e o crescimento inicial

O trabalho foi conduzido em casa de vegetação climatizada e repetido duas vezes em delineamento experimental completamente casualizado e arranjo fatorial 4x7, sendo o fator A constituído pelos genótipos de arroz cultivado Nipponbare e IRGA 417 e pelos genótipos de arroz daninho AV04 e ITJ03, e o fator B de alturas de lâmina de água (2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 12,5 e 15,0 cm acima do solo) além da testemunha (solo na capacidade de campo). Foram utilizadas quatro repetições para cada tratamento, sendo que cada repetição consistiu em 10 sementes.

Inicialmente as sementes foram expostas a temperatura de 50 °C por cinco dias para quebra de dormência, e após foram semeadas a 0,5 cm de profundidade em embalagens plásticas de 300 ml contendo solo (Argissolo) acrescido de composto orgânico (10:1) e, em seguida submetidas aos referidos tratamentos. A concentração de oxigênio (mg.L^{-1}) na superfície do solo e a 0,5 cm de profundidade, nas diferentes alturas de lâminas de água foi determinada diariamente através de oxímetro digital (DIGIMED/DM-4). Diariamente foi realizada a manutenção das alturas de lâminas de água correspondentes aos diferentes tratamentos. Aos 21 dias após a semeadura (DAS) foram avaliados a emergência final (%), estatura de planta (cm) e matéria seca (mg. planta^{-1}).

A análise estatística consistiu de análise de variância ($\alpha=5\%$) e, sendo observada interação dos fatores avaliados foi realizado ajuste dos dados ao modelo logístico ou sigmoidal de três parâmetros, sendo $Y=a/1+(x/c)^b$ ou $Y=1+\exp(-(x-x_0)/b)$, respectivamente.

3.2.2 II - Avaliação de genótipos de arroz daninho quanto a tolerância à submersão

O estudo foi conduzido em casa de vegetação climatizada em delineamento experimental completamente casualizado e arranjo fatorial 160x3, sendo o fator A

constituído de genótipos de arroz (cultivares Nipponbare e IRGA 417 e 158 genótipos de arroz daninho, conforme a Tabela 1), e o fator B de alturas de lâmina de água (5,0 e 10,0 cm acima do solo, determinadas a partir do primeiro estudo) além da testemunha (solo saturado). Foram utilizadas quatro repetições para cada tratamento, sendo que cada repetição consistiu em 10 sementes.

TABELA 1. Genótipos de arroz utilizados para o estudo de investigação da tolerância ao alagamento na germinação e o crescimento inicial de arroz daninho. Faculdade de Agronomia – UFRGS, Porto Alegre, 2015.

Genótipo	Tipo	Origem
IRGA 417	Cultivado	IRGA – 2010
Nipponbare	Cultivado	EPAGRI – 2010
101 ao 223* ¹	Arroz daninho	IRGA -2010
400 ao 403	Arroz daninho	SÃO JOÃO POLÊSINE – 2015
500 ao 531	Arroz daninho	AGUDO – 2015
600 ao 617	Arroz daninho	CANDELÁRIA – 2015
700 ao 704	Arroz daninho	PARAÍSO DO SUL – 2015
800 ao 806	Arroz daninho	RESTINGA SECA – 2015
900 ao 963* ²	Arroz daninho	IRGA – 2009
ITJ01 ao ITJ144* ³	Arroz daninho	EPAGRI – 2010
AV04 ao AV198* ⁴	Arroz daninho	IRGA – 2009

*Série numérica incompleta quanto ao número de genótipos, sendo 1=39; 2=30; 3=6 e 4=17 genótipos.

O preparo das sementes, semeadura e determinação da concentração de oxigênio foram realizados conforme descrito para o estudo I. A avaliação da emergência foi realizada aos 21 dias após a semeadura (DAS). A manutenção das alturas de lâminas de água correspondentes aos diferentes tratamentos foi diária. A análise estatística consistiu de análise de variância ($\alpha=5\%$) e, sendo observada diferença significativa foram realizado a comparadas as médias pelo teste de Tukey ($p\leq 0,05$).

3.2.3 III - Efeito da temperatura sobre a tolerância à submersão em arroz daninho

O estudo foi conduzido em câmaras de crescimento (BDR16 - Conviron) e repetido duas vezes em delineamento experimental completamente casualizado, em arranjo fatorial 3x3x5, sendo o fator A: temperatura (20, 25 e 30 °C); fator B: alturas de lâmina de água (5,0 e 10,0 cm acima do solo) e testemunha com solo saturado; fator C: 5 genótipos de arroz (cultivares Nipponbare e IRGA 417 e os genótipos de arroz daninho ITJ03, AV04 e ITJ01). Os genótipos ITJ03, AV04 e ITJ01 foram caracterizados como tolerante, mediantemente tolerante e não tolerante ao alagamento, respectivamente durante a germinação e o crescimento inicial, conforme os resultados do experimento II. Foram utilizadas 4 repetições para cada tratamento, onde cada repetição consistiu em 10 sementes. O preparo das sementes, semeadura e determinação da concentração de oxigênio foi realizado conforme descrito anteriormente. As sementes foram depositadas a 0,5 cm de profundidade.

As avaliações da emergência foram realizadas aos 14, 21 e 28 dias após a semeadura (DAS) e o comprimento da parte aérea (CPA) aos 28 DAS. A determinação do CPA foi realizada em quatro plantas emergidas de cada tratamento, totalizando 16 plantas por tratamento. Diariamente foi realizada a manutenção das alturas de lâminas de água correspondentes aos diferentes tratamentos. A análise estatística consistiu de análise de variância ($\alpha=5\%$) e, sendo observada diferença significativa foram comparadas médias pelo teste de Tukey ($p\leq 0,05$).

3.2.4 IV - Influência da pálea e lema e da profundidade do solo na tolerância ao alagamento em arroz daninho

O trabalho foi conduzido em casa de vegetação climatizada, repetido duas vezes em delineamento experimental completamente casualizado e arranjo fatorial 2x3x7x5, sendo o fator A: presença ou ausência da pálea e lema nas sementes; fator B: alturas de lâmina de

água (5,0 e 10,0 cm acima do solo) e testemunha com solo saturado; fator C: 7 profundidades de semeadura (superfície, 0,25; 0,50; 1,00; 2,00; 4,00 e 8 cm de profundidade) e fator D: 5 genótipos de arroz (cultivares Nipponbare e IRGA 417 e os genótipos de arroz daninho ITJ03, AV04 e ITJ01).

Os genótipos ITJ03, AV04 e ITJ01 foram caracterizados como tolerante, mediantemente tolerante e não tolerante ao alagamento, respectivamente durante a germinação e o crescimento inicial, conforme os resultados do experimento II. Foram utilizadas três repetições para cada tratamento, onde cada repetição consistiu em 10 sementes. As sementes de cada genótipo, foram submetidas a quebra de dormência pelo período de 5 dias a temperatura de 50 °C. Em seguida, as sementes dos referidos tratamentos a lema e pálea foram removidas manualmente e as demais permaneceram integras (com lema e pálea). Cada unidade experimental correspondeu a embalagens plásticas de 300 ml contendo solo do tipo argissolo e composto orgânico, na proporção de 10:1.

A avaliação da emergência foi realizada aos sete, 14 e 21 dias após a semeadura (DAS), enquanto a determinação da matéria seca da parte aérea (MSPA) foi realizada aos 21. Diariamente foi realizada a manutenção das alturas de lâminas de água correspondentes aos diferentes tratamentos. A análise estatística consistiu de análise de variância ($\alpha=5\%$) e, sendo observada interação dos fatores avaliados foi realizado ajuste dos dados ao modelo logístico de três parâmetros: $Y=a/1+(X+X0_{50})^b$.

3.3 resultados e discussão

3.3.1 I- Determinação de método diagnóstico para tolerância de arroz daninho à submersão durante a germinação e o crescimento inicial

Os valores obtidos para a concentração de oxigênio demonstram interação

significativa ($p < 0,05$) dos fatores altura de lâmina de água e período de inundação (Figura 1). A quantidade de oxigênio presente na superfície do solo no tratamento de solo apenas saturado não variou significativamente durante o período de avaliação (Figura 1A). No entanto, todos os demais tratamentos demonstraram redução significativa no conteúdo de oxigênio presente em decorrência da inundação, com estabilização do conteúdo de oxigênio a partir do décimo dia após a instalação do experimento. A quantidade de oxigênio na superfície do solo aos 21 dias após a inundação variou de 3,70 até 1,85 mg/L para os tratamentos com 2,5 e 15,0 cm de lâmina de água, respectivamente.

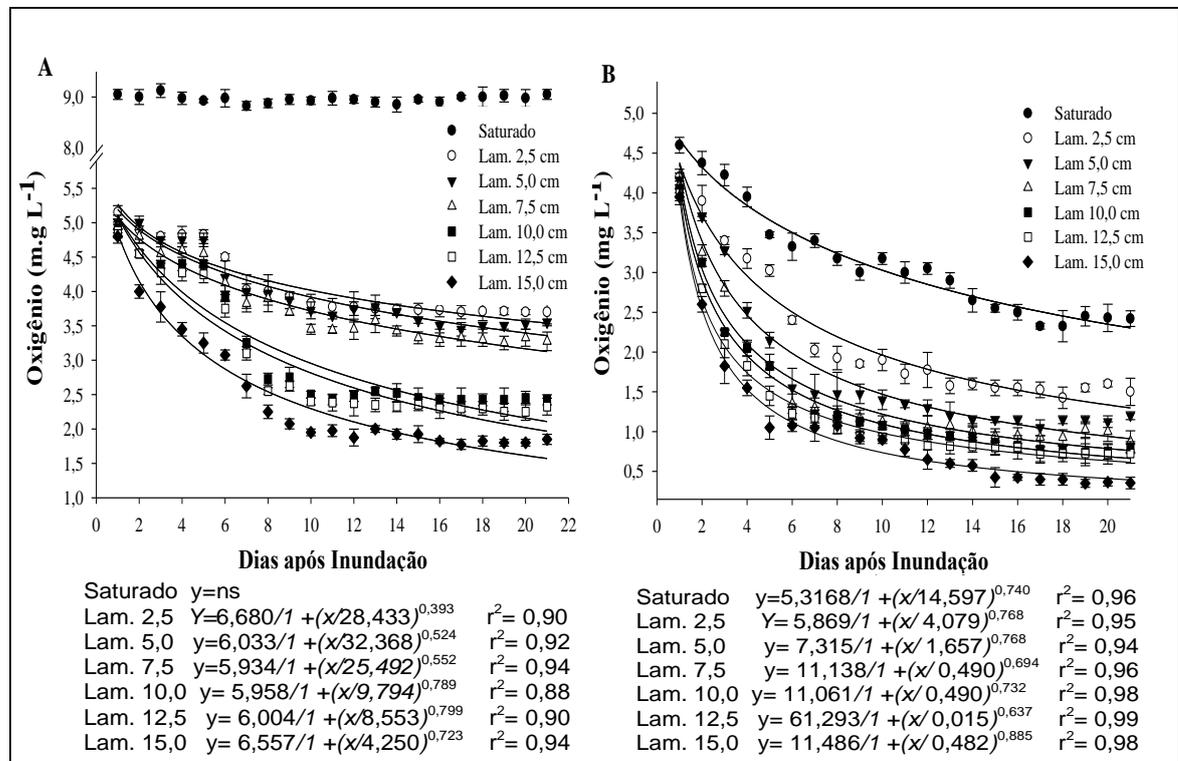


FIGURA 1. Concentração de oxigênio (mg L⁻¹) presente na lâmina de água logo acima do solo (A) e em 0,5 cm de profundidade (B) em função das diferentes alturas de lâmina de água. Os gráficos foram plotados com a média de quatro repetições e as barras verticais indicam o intervalo de confiança ($\alpha = 0,05$). UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil. 2015.

A quantificação de oxigênio a 0,5 cm de profundidade no solo, profundidade de semeadura dos genótipos de arroz, apresentou comportamento similar aos observados na superfície do solo, contudo a redução foi mais acentuada para o tratamento com 15,0 cm de

lâmina de água, com quantidade residual dessa molécula de apenas $0,35\text{mg L}^{-1}$ aos 21 dias (Figura 1B). Em estudo similar, com presença de apenas 3 cm de lâmina de água, a quantidade de oxigênio presente foi próxima de $0,20\text{mg L}^{-1}$ na profundidade do solo de 0,35 cm, enquanto que em profundidades de solo superiores a 0,5 cm foi observada a ausência dessa molécula (Wang *et al.*, 2015).

A redução na concentração de oxigênio observada em solo sob 15 cm de lâmina de água, de 4 mg L^{-1} na instalação do experimento para $0,35\text{ mg L}^{-1}$ aos 21DAS, é resultante do consumo dessa molécula, por parte de microrganismos anaeróbicos facultativos presentes no solo e da baixa capacidade de difusão da mesma pela camada de água (Luxmoore *et al.*, 1970, Wang *et al.*, 2015). Deste modo, ocorre a formação de um gradiente de concentração de oxigênio, levando à formação de duas camadas distintas: uma de oxidação e outra de redução, pois um solo submerso não é uniformemente desprovido do oxigênio (Wang *et al.*, 2015). A concentração do oxigênio pode ser maior na camada superficial do solo submerso, e atingir valores próximos de zero em camadas de 0,3 a 0,5 cm (Kludze & Delaune, 1995; Wang *et al.*, 2015). Portanto, a quantidade de oxigênio disponível para as sementes de arroz germinarem sob o solo é menor quando comparada à disponibilidade desse elemento na superfície do solo inundado.

A avaliação de emergência em condição de submersão demonstrou que as duas cultivares utilizadas, Nipponbare e IRGA 417, apresentam baixa capacidade de suportar a submersão durante a germinação e o crescimento inicial, obtendo emergência quando comparado à testemunha em torno de 14 e 0% para a lâmina de água de 5,0 cm, respectivamente (Figura 2A). Já os genótipos de arroz daninho apresentaram comportamentos distintos, sendo que o AV04 reduziu em mais de 50% a emergência na lâmina de 7,5 cm quando comparado à testemunha. Já o genótipo ITJ03 apresentou emergência em torno de 70% na lâmina de 10 cm e, mesmo na maior lâmina (15 cm), apresentou cerca de 25% de emergência, em comparação à testemunha. Resultados

semelhantes foram obtidos para acessos contrastantes de arroz daninho da Índia, onde sob 10 cm de lâmina de água a emergência variou de 0 a 60% (Wang *et al.*, 2015).

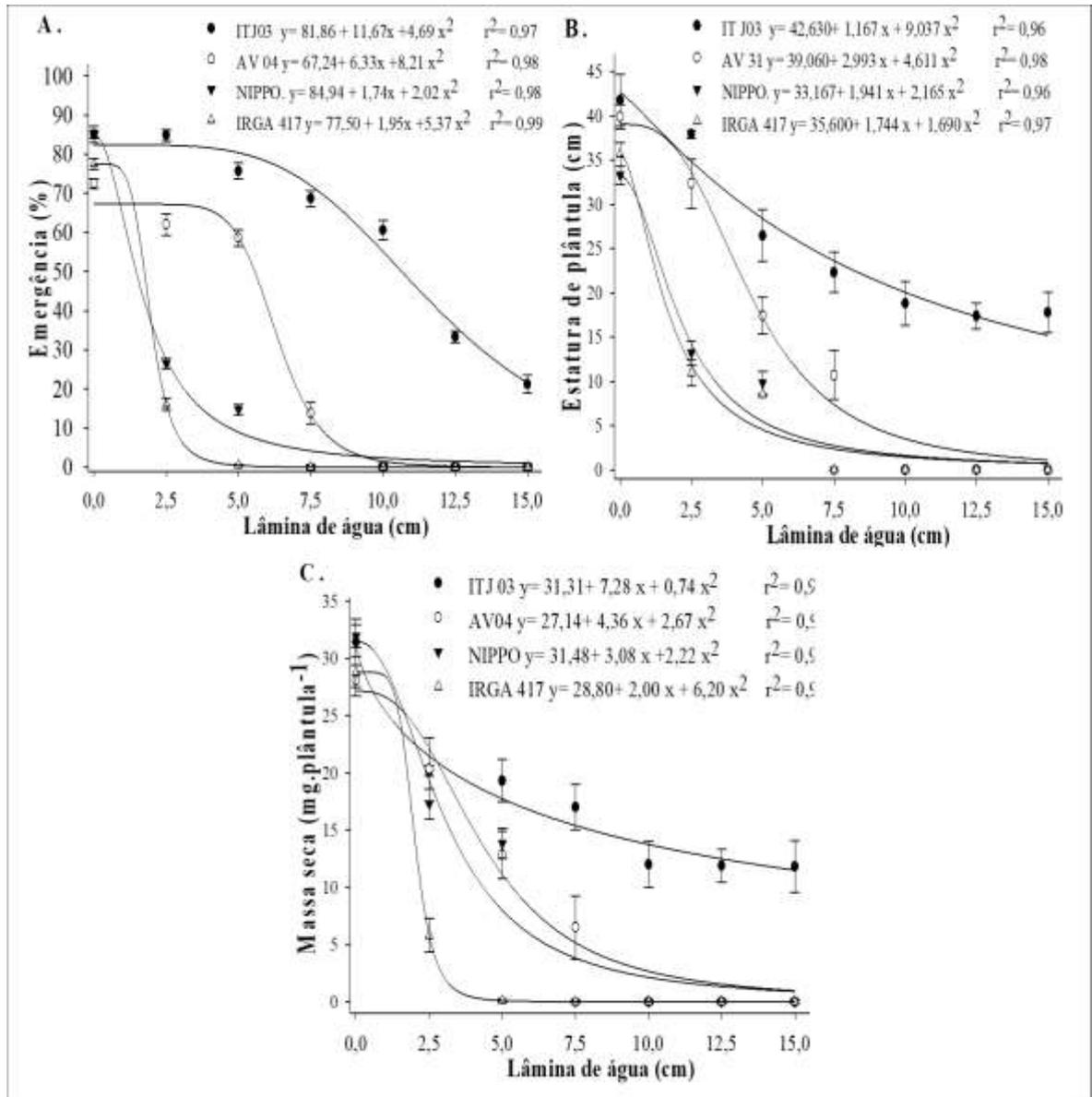


FIGURA 2. Emergência (A), estatura (B) e matéria seca (C) de genótipos de arroz irrigado e genótipos de arroz daninho submetidos a diferentes alturas de lâmina de água 21 dias após a semeadura (DAS). Os gráficos foram plotados com a média de quatro repetições e as barras verticais indicam o intervalo de confiança ($\alpha = 0,05$). UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil. 2015.

A estatura de planta e o acúmulo de matéria seca por plântula apresentaram comportamento similar ao percentual de emergência. Ocorreu redução acentuada da matéria seca para as duas cultivares de arroz, nas lâminas de água inferiores, comportamento

mediano do genótipo AV04 e acúmulo de matéria seca próxima a 50% para o genótipo ITJ03 mesmo nas lâminas de 12,5 e 15,0 cm de água (Figura 2B e 2C). O crescimento inicial das plântulas juntamente com a emergência são parâmetros utilizados para seleção de genótipos tolerantes de arroz cultivado ao alagamento por serem responsivos ao estresse e de fácil mensuração (Miro & Ismail, 2013). Deste modo, estes parâmetros poderão ser utilizados de forma isolada ou em conjunto para aferir a tolerância diferencial de arroz daninho ao alagamento.

A utilização de lâmina de água com altura de 10 cm mostrou ser eficiente na redução do conteúdo de oxigênio no interior do solo e foi capaz de selecionar genótipos de arroz daninho com elevada capacidade de tolerar alagamento no estabelecimento. Enquanto isso, lâmina de 5 cm permite a maior difusão de oxigênio para o solo e discrimina genótipos de média tolerância ao alagamento e aqueles que se encontram ainda em fase de evolução para essa característica. Esses parâmetros podem ser utilizados para a seleção de grande número de genótipos de arroz daninho, sendo a primeira etapa para estudos de caracterização genética e elucidação do mecanismo de tolerância ao alagamento envolvido, bem como para traçar novas estratégias para seu controle.

3.3.2 II - Avaliação de genótipos de arroz daninho quanto a tolerância à submersão

Os resultados obtidos demonstram interação significativa ($p < 0,05$) dos fatores altura de lâmina de água e genótipo de arroz (Tabela 2). Os genótipos de arroz daninho e as cultivares de arroz apresentaram elevada capacidade de estabelecimento em condição de solo saturado, com emergência superior a 70%. As cultivares de arroz Nipponbare e IRGA 417 apresentaram baixa capacidade de suportar submersão durante a germinação e o crescimento inicial, na comparação com a testemunha, com emergência em torno de 24 e 16 % para a lâmina de água de 5 cm, respectivamente, enquanto que sob lâmina de 10 cm, ambas

cultivares, não apresentaram emergência. Resultados semelhantes foram obtidos anteriormente para as variedades do sudeste asiático 8391 e 8753, que emergiram sob 5 cm de lâmina de água, enquanto que a cultivar Nippombare e IR46 foram caracterizadas como moderadamente sensível e sensível ao alagamento, respectivamente (Hsu & Tung, 2017). Neste contexto, a tolerância diferenciada é resultante da adaptação de determinados genótipos à condição de estresse pois, de forma geral, o arroz cultivado é sensível a condições anaeróbicas durante a germinação e o crescimento inicial do embrião (Ismail *et al.*, 2009; Angaji *et al.*, 2010).

Respostas diferenciais ao alagamento foram observadas entre os 158 genótipos de arroz daninho avaliados. Para a lâmina de 5 cm apenas, 13 genótipos obtiveram emergência superior a 50%, dentre os quais 604, 802, 924 e ITJ03 (Tabela 2). Enquanto isso, 144 acessos de arroz daninho apresentaram percentual de emergência entre 0 e 49% e, ainda 16 genótipos não germinaram sob lâmina de água. Em estudos com quatro acessos de arroz daninho submetidos a 5 cm de lâmina de água desempenho similar foi observado, onde a emergência não ultrapassou 40% (Chauhan, 2012). Portanto, a tolerância ao alagamento está em franca evolução podendo comprometer a utilização da lâmina de água como método de controle do arroz daninho.

Com lâmina de água de 10 cm, apenas o genótipo ITJ03 apresentou elevada capacidade de estabelecimento, apresentando emergência de 88% (Tabela 2). Ainda, 77 genótipos demonstraram estar em evolução para a tolerância ao alagamento nas fases iniciais de desenvolvimento, com emergências variando de 0 a 49%. Anteriormente capacidade diferencial também foi observada para oito diferentes acessos de arroz daninho com suspeita de tolerância ao alagamento provenientes da Índia, onde apenas um genótipo obteve desempenho em torno de 50% de emergência quando semeado sob 10 cm de lâmina de água (Ghosh *et al.*, 2017). Enquanto que para acessos provenientes da China, não ocorreu emergência de arroz daninho quando submetidos a lâmina superior a 8 cm (Chauhan, 2012).

Assim como para os acessos da Índia e China, a elevada tolerância apresentada pelo genótipo ITJ03 pode estar associada ao maior tempo de seleção em submersão, uma vez que este genótipo é proveniente de área cultivada por muitos anos sob o sistema pré-germinado.

TABELA 2. Emergência (%) de genótipos de arroz daninho submetidos a diferentes alturas de lâmina de água. UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil, 2015.

Ecótipo	Sat***	5cm	10cm	Continuação...			
				Ecótipo	Sat***	5cm	10cm
101	A 83,33 b	B 4,00 ef	B 0,00 d				
102	A 73,33 bc	B 22,72de	B 0,00 d	402	A 33,33 de	B 0,00 f	B 0,00 d
103	A 70,00 bc	B 71,43 b	C 23,80 c	403	A 83,33 b	B 8,00 ef	B 0,00 d
104	A 70,00 bc	B 33,33 cd	C 0,00 d	500	A 70,00 bc	B 4,76 ef	B 4,76 cd
105	A 73,33 bc	B 22,72de	C 0,00 d	501	A 73,33 bc	B 9,09 e	B 4,54 cd
106	A 70,00 bc	B 28,57 d	C 0,00 d	502	A 66,67 c	B 20,00 de	B 10,00 cd
107	A 86,67 ab	B 38,46 cd	B 26,93 c	503	A 76, 67 bc	B 26,08 de	B 17,39 cd
108	A 70,00 bc	B 23,81 de	B 14,28 cd	504	A 76, 67 bc	B 17,39 de	B 4,34 cd
109	A 70,00 bc	B 0,00 f	B 0,00 d	505	A 80,00 b	B 12,51 de	B 8,33 cd
111	A 80,00 b	B 39,67 cd	C 15,00 cd	506	A 43,33 d	A 23,07 de	B 0,00 d
112	A 76, 67 bc	B 39,13 cd	C 8,69 cd	507	A 76, 67 bc	B 17,39 de	B 0,00 d
113	A 53,33 cd	B 18,75 de	B 0,00 d	508	A 83,33 b	B 28,00 d	C 0,00 d
114	A 76, 67 bc	B 8,69 ef	B 8,69 cd	509	A 23,33 e	A 27,69 bc	B 8,69 cd
115	A70,00 bc	B 4,76 ef	B 0,00 d	510	A 23,33 e	A 36,36 cd	B 0,00 d
116	A 86,67 ab	B 30,81 d	B 15,38 cd	511	A 76, 67 bc	B 8,69 ef	B 4,34 cd
117	A 66,67 c	B 5,00 ef	B 0,00 d	512	A 76, 67 bc	B 0,00 f	B 0,00 d
118	A 73,33 bc	B 31,81 cd	B 13,63 cd	513	A 70,00 bc	B 33,33 cd	C 0,00 d
119	A 63,33 c	B 52,63 bc	C 5,26 cd	514	A 63,33 c	B 36,84 cd	B 21,01 c
120	A 73,33 bc	B 27,23 d	B 18,18 cd	515	A 63,33 c	B 26,31 de	C 0,00 d
121	A 83,33 b	B 20,00 de	B 8,00 cd	516	A 83,33 b	B 16,00 de	B 0,00 d
122	A 86,67 ab	B 11,53 de	B 0,00 d	517	A 66,67 c	B 40,00 cd	C 5,00 cd
123	A 76, 67 bc	B 17,39 de	B 4,34 cd	518	A 76, 67 bc	B 30,40 d	C 4,34 cd
124	A 73,33 bc	B 27,23 d	B 4,54 cd	519	A 60,00 c	B 22,72de	C 0,00 d
125	A 76, 67 bc	B 4,16 ef	B 0,00 d	520	A 73,33 bc	B 0,00 f	B 0,00 d
128	A 80,00 b	B 16,67 de	B 8,33 cd	521	A 80,00 b	B 62,50 bc	C 0,00 d
130	A 80,00 b	B 20,83 de	B 16, 67 cd	522	A 56,67 cd	B 5,88 ef	B 5,88 cd
131	A 66,67 c	B 14,99 de	B 0,00 d	523	A 56,67 cd	B 5,88 ef	B 0,00 d
133	A 83,33 b	B 36,00 cd	B 40,00 b	524	A 53,33 cd	B 12,51 de	B 0,00 d
134	A 80,00 b	B 0,00 f	B 0,00 d	525	A 50,00 cd	B 0,00 f	B 0,00 d
136	A 90,00 a	B 44,44 c	C 7,40 cd	526	A 76, 67 bc	B 30,40 d	C 0,00 d
137	A 76, 67 bc	B 17,39 de	B 8,69 cd	527	A 70,00 bc	B 9,52 e	B 0,00 d
138	A 60,00 c	B 10,98 e	B 5,49 cd	528	A 60,00 c	B 16,67 de	B 0,00 d
139	A 73,33 bc	B 9,09 e	B 0,00 d	529	A 86,67 ab	B 15,38 de	B 0,00 d
140	A 66,67 c	B 14,99 de	B 10,00 cd	530	A 83,33 b	B 36,00 cd	C 4,00 cd
144	A 70,00 bc	B 14,31 de	B 0,00 d	531	A 60,00 c	A 50,00 c	B 0,00 d
150	A 80,00 b	B 4,16 ef	B 0,00 d	600	A 66,67 c	B 25,01 de	C 0,00 d
172	A 73,33 bc	B 13,63 de	B 9,09 cd	601	A 73,33 bc	B 0,00 f	B 0,00 d
182	A 73,33 bc	B 27,23 d	C 0,00 d	602	A 80,00 b	B 8,33 ef	B 4,16 cd
223	A 86,67 ab	B 11,53 de	B 0,00 d	603	A 66,67 c	B 25,01 de	C 0,00 d
400	A 80,00 b	B 4,16 ef	B 4,16 cd	604	A 70,00 bc	A 66,67 bc	B 9,52 cd
401	A 50,00 cd	B 0,00 f	B 0,00 d		Continua...		

*Médias seguidas pela mesma letra maiúsculas na linha e minúsculas na coluna, não diferem pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$). **Médias de quatro repetições da emergência para 5,00 e 10,0 cm de lâmina de água calculadas em função da emergência de cada genótipo, ***Solo saturado

Continuação da Tabela 2 Emergência (%) de genótipos de arroz daninho submetidos a diferentes alturas de lâmina de água. UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil, 2015.

Ecótipo	Sat***	5cm	10cm	Continuação...			
				Ecótipo	Sat***	5cm	10cm
605	A 76, 67 bc	B 8,69 ef	B 4,34 cd	920	A 100,00 a	B 6,67 ef	B 0,00 d
606	A 83,33 b	B 16,00 de	B 12,00 cd	921	A 83,33 b	B 20,00 de	B 16,00 cd
607	A 73,33 bc	B 0,00 f	B 0,00 d	922	A 66,67 c	B 30,00 d	B 10,00 cd
608	A 76, 67 bc	B 13,00 de	B 8,69 cd	923	A 60,00 c	B 44,44 c	B 38,88 b
609	A 76, 67 bc	B 39,13 cd	C 17,39 cd	924	A 90,00 a	B 66,67 bc	C 37,03 bc
610	A 63,33 c	B 42,10 c	C 0,00 d	925	A 76, 67 bc	B 21,73 de	B 8,69 cd
611	A 70,00 bc	B 52,38 bc	C 0,00 d	929	A 66,67 c	B 30,00 d	C 0,00 d
612	A 56,67 cd	B 0,00 f	B 0,00 d	932	A 96,67 a	B 13,79 de	B 0,00 d
613	A 60,00 c	A 50,00 c	B 0,00 d	937	A 60,00 c	B 11,11 e	B 0,00 d
614	A 73,33 bc	B 50,00 c	C 0,00 d	939	A 90,00 a	B 18,51 de	B 14,81 cd
615	A 53,33 cd	B 0,00 f	B 0,00 d	954	A 76, 67 bc	B 17,39 de	B 0,00 d
616	A 53,33 cd	B 0,00 f	B 0,00 d	961	A 96,67 a	B 3,44 ef	B 0,00 d
617	A 76, 67 bc	B 8,69 ef	B 0,00 d	962	A 76, 67 bc	B 30,40 d	C 0,00 d
700	A 56,67 cd	A 58,81 bc	C 0,00 d	963	A 70,00 bc	B 0,00 f	B 0,00 d
701	A 66,67 c	B 45,00 c	C 0,00 d	AV04	A 73,33 bc	B 27,23 d	C 9,09 cd
702	A 76, 67 bc	B 17,39 de	B 13,00 cd	AV104	A 86,67 ab	B 30,81 d	B 30,76 bc
703	A 63,33 c	B 5,26 ef	B 0,00 d	AV109	A 80,00 b	B 54,17 bc	C 29,16 bc
704	A 83,33 b	B 8,00 ef	B 0,00 d	AV110	A 76, 67 bc	B 21,73 de	B 8,69 cd
800	A 73,33 bc	B 4,54 ef	B 4,54 cd	AV121	A 66,67 c	B 20,00 de	B 10,00 cd
801	A 66,67 c	A 60,00 bc	C 19,99 c	AV15P	A 76, 67 bc	B 0,00 f	B 0,00 d
802	A 96,67 a	B 10,34 e	B 3,44 cd	AV15V	A 80,00 b	B 25,01 de	C 0,00 d
803	A 70,00 bc	B 28,57 d	B 14,28 cd	AV198	A 73,33 bc	B 40,91 c	C 9,09 cd
804	A 53,33 cd	B 6,25 ef	B 6,25 cd	AV22	A 76, 67 bc	B 39,13 cd	B 47,82 b
805	A 56,67 cd	B 0,00 f	B 0,00 d	AV25	A 73,33 bc	B 36,36 cd	B 31,81 bc
806	A 80,00 b	B 37,50 cd	C 0,00 d	AV31	A 83,33 b	B 12,00 de	B 0,00 d
900	A 83,33 b	B 12,00 de	B 12,00 cd	AV38	A 70,00 bc	B 38,09 cd	C 4,76 cd
901	A 26,67 de	B 0,00 f	B 0,00 d	Av53	A 76, 67 bc	B 0,00 f	B 0,00 d
902	A 76, 67 bc	B 8,69 ef	B 0,00 d	AV60	A 73,33 bc	B 18,51 de	B 9,09 cd
903	A 73,33 bc	B 4,54 ef	B 0,00 d	AV75P	A 86,67 ab	B 11,53 de	B 3,83 cd
905	A 83,33 b	B 16,00 de	B 8,00 cd	AV75V	A 83,33 b	B 12,00 de	B 0,00 d
906	A 86,67 ab	B 15,38 de	B 11,53 cd	AV98	A 76, 67 bc	B 30,40 d	B 30,43 bc
907	A 86,67 ab	B 11,53 de	B 0,00 d	IRGA 417	A 80,00 b	B 16,67 de	B 0,00 d
908	A 93,33 a	B 0,00 f	B 0,00 d	ITJ01	A 80,00 b	B 16,67 de	B 0,00 d
910	A 60,00 c	B 5,55 ef	B 0,00 d	ITJ03	A 93,33 a	A 92,00 a	A 88,00 a
911	A 33,33 de	B 10,00 e	B 10,00 cd	ITJ08	A 80,00 b	B 0,00 f	B 0,00 d
912	A 93,33 a	B 25,01 de	B 7,14 cd	ITJ11	A 73,33 bc	B 18,51 de	B 4,54 cd
914	A 76, 67 bc	B 43,47 c	C 21,73 c	ITJ144	A 86,67 ab	B 0,00 f	B 0,00 d
915	A 73,33 bc	B 9,09 e	B 9,09 cd	ITJ24	A 73,33 bc	B 13,63 de	B 4,54 cd
916	A 66,67 c	B 20,00 de	B 19,99 c	NIPO	A 83,33 b	B 24,01 de	B 0,00 d
917	A 63,33 c	B 5,26 ef	B 0,00 d				
918	A 90,00 a	B 18,51 de	B 7,40 cd	CV (%)		27	

*Médias seguidas pela mesma letra maiúsculas na linha e minúsculas na coluna, não diferem pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$). **Médias de quatro repetições da emergência para 5,00 e 10,0 cm de lâmina de água calculadas em função da emergência de cada genótipo, ***Solo saturado

A seleção de arroz daninho quanto a tolerância à submersão indicou a existência de um genótipo com elevada tolerância durante a emergência, e de outros com tolerância intermediária. A variabilidade existente entre os genótipos de arroz daninho indica evolução da adaptação frente à utilização da lâmina de água como controle nos sistemas de cultivo pré-germinado ou transplante, acarretando na redução da eficácia dessa importante ferramenta de manejo.

3.3.3 III - Efeito da temperatura sobre a tolerância à submersão em arroz daninho

A análise de variância demonstrou interação significativa dos efeitos de temperaturas, genótipos de arroz e profundidade de lâmina de água (Tabela 3 e 4). Aos sete dias após a semeadura (DAS) a temperatura de 20 °C em ambas lâminas de água não permitiu a emergência dos genótipos de arroz. Enquanto que nas temperaturas de 25 e 30 °C, o genótipo ITJ03 obteve na lâmina de 10 cm, emergência de 57,5 e 32,5 %, respectivamente.

A emergência dos genótipos de arroz avaliada aos 14 DAS foi influenciada pela presença da lâmina de água de 5 cm, onde apenas o genótipo ITJ03 foi capaz de emergir em todas as temperaturas com 22,5; 82,5 e 90,0% de emergência para 20, 25 e 30 °C, respectivamente. Enquanto as cultivares Nipponbare e IRGA 417 obtiveram apenas 5,0% de emergência na presença de 10 cm de lâmina de água e temperatura de 25 °C (Tabela 3). Aos 21 DAS, é destacada a capacidade diferencial do genótipo de arroz daninho ITJ03 em se estabelecer sob todas as condições avaliadas, em especial sob temperatura de 30 °C, quando a emergência atingiu 90% mesmo sob 10 cm de lâmina de água.

TABELA 3. Emergência (%) de genótipos de arroz em diferentes temperaturas e condições de alagamento aos 07, 14, 21 e 28 dias após a semeadura (DAS). UFRGS, Porto Alegre – RS, 2017.

07 DAS									
Genótipos	20 °C			25 °C			30 °C		
	Sat	5cm	10cm	Sat	5cm	10cm	Sat	5cm	10cm
Nippo.	A 50 β b	B 0,0 β a	B 0,0 α a	A 60,0 α b	B 10,0 α c	B 2,5 α c	A 57,5 α c	B 0,0 β c	B 0,0 α b
IRGA417	A 60 β ab	B 0,0 β a	B 0,0 α a	A 90,0 α a	B 12,5 α c	C 2,5 α c	A 82,5 α a	B 0,0 α c	B 0,0 α b
ITJ03	A 57,5 β ab	B 0,0 γ a	B 0,0 γ a	A 87,5 α a	B 65,0 α a	B 57,5 α a	A 82,5 α a	B 30,0 β a	A 32,5 β a
AV04	A 67,5 γ a	B 0,0 γ a	B 0,0 β a	A 82,5 α a	B 27,5 α b	C 12,5 α b	A 75,0 β ab	B 10,0 β b	B 2,5 β b
ITJ01	A 67,5 α a	B 0,0 β a	B 0,0 β a	A 67,5 α b	B 22,5 α b	C 12,5 α b	A 65,0 α bc	B 7,5 α b	B 5,0 β b
CV (%)	12,75								
14 DAS									
Genótipos	20 °C			25 °C			30 °C		
	Sat	5cm	10cm	Sat	5cm	10cm	Sat	5cm	10cm
Nippo.	A 67,5 β a	B 0,0 β b	B 0,0 β a	A 82,5 α b	B 20,0 α d	C 5,0 α c	A 70,0 β c	B 2,5 β d	B 2,5 β c
IRGA417	A 67,5 β a	B 0,0 β b	B 0,0 β a	A 90,0 α a	B 22,5 α d	C 5,0 β c	A 87,5 α a	B 30,0 α c	C 22,5 α b
ITJ03	A 72,5 β a	B 22,5 β a	C 0,0 β a	A 92,5 α a	B 82,5 α a	B 85,0 α a	A 87,5 α a	A 90,0 α a	A 90,0 α a
AV04	A 35,0 γ b	B 0,0 γ b	B 0,0 β a	A 87,5 α a	B 45,0 α b	C 25,0 α b	A 77,5 β b	B 32,5 β bc	C 0,0 β c
ITJ01	A 67,5 β a	B 0,0 β b	B 0,0 β a	A 70,0 β c	B 32,5 α c	C 20,0 α c	A 82,5 α ab	B 37,5 α b	C 22,5 α b
CV (%)	18,85								
21 DAS									
Genótipos	20 °C			25 °C			30 °C		
	Sat	5cm	10cm	Sat	5cm	10cm	Sat	5cm	10cm
Nippo.	A 67,5 α b	B 0,0 γ b	B 0,0 β a	A 85,0 α b	B 25,0 α d	C 5,0 α c	A 82,5 α b	B 10,0 β d	C 2,5 β c
IRGA417	A 85,0 α a	B 0,0 β b	B 0,0 β a	A 95,0 α a	B 35,0 α c	C 7,5 β c	A 92,5 α a	B 30,0 α c	C 22,5 α b
ITJ03	A 82,5 β a	B 37,5 β a	C 0,0 β a	A 92,5 α ab	A 87,5 α a	A 90,0 α a	A 90,0 α ab	A 90,0 α a	A 90,0 α a
AV04	A 67,5 β b	B 5,0 β b	B 0,0 β a	A 87,5 α ab	B 47,5 α b	C 27,5,0 α b	A 85,0 α ab	B 45,0 α b	C 0,0 β c
ITJ01	A 80,0 β a	B 0,0 γ b	B 0,0 γ a	A 72,5,5 α c	B 37,5 β c	C 25,0 α b	A 87,5 α ab	B 50,0 α b	C 22,5 β b
CV (%)	15,23								
28 DAS									
Genótipos	20 °C			25 °C			30 °C		
	Sat	5cm	10cm	Sat	5cm	10cm	Sat	5cm	10cm
Nippo.	A 82,5 α b	B 0,0 γ c	B 0,0 β a	A 85,0 α c	B 25,0 α d	C 5,0 α c	A 82,5 α b	B 10,0 β d	C 2,5 β c
IRGA417	A 92,5 α a	B 0,0 β c	B 0,0 β a	A 95,0 α a	B 35,0 α c	C 7,5 β c	A 92,5 α a	B 30,0 α c	C 22,5 α b
ITJ03	A 82,5 β b	B 32,5 β a	C 0,0 β a	A 92,5 α ab	A 90,0 α a	A 90,0 α a	A 92,5 α ab	A 90,0 α a	A 90,0 α a
AV04	A 82,5 β b	B 12,5 β b	C 0,0 β a	A 87,5 α bc	B 47,5 α b	C 35,0 α b	A 87,5 α ab	B 45,0 α b	C 0,0 β c
ITJ01	A 82,5 β b	B 0,0 γ c	B 0,0 γ	A 87,5 α bc	B 37,5 β c	C 27,0 α b	A 87,5 α ab	B 50,0 α b	C 22,5 β b
CV (%)	14,75								

*Médias antecedidas por letras maiúsculas distintas, comparam nas linhas (Alagamento), letras minúsculas diferentes comparam nas colunas (Genótipos) e letras gregas comparam entre as temperaturas, dentro dos mesmos genótipos e condição de alagamento, tukey ($p \leq 0,05$).

Na avaliação final de emergência realizada aos 28 DAS, o efeito da temperatura baixa combinado com a maior lâmina impediu a emergência de todos os genótipos de arroz daninho (Tabela 3). Na temperatura 20 °C os genótipos de arroz daninho ITJ03 e AV04

apresentaram emergência apenas com 5 cm de lâmina de água, sendo 32,5 e 12,5%, respectivamente. A temperatura de 30 °C ocasionou incremento de 33,3% no percentual de emergência para o genótipo ITJ01 na condição de 5 cm de lâmina de água quando comparado com a mesma condição na temperatura de 25 °C. Enquanto que a emergência do genótipo ITJ03 nas temperaturas de 25 e 30 °C não diferiu da testemunha sem alagamento, na comparação com a condição de presença de lâmina de água de até 10 cm. Desta forma pode se inferir a atuação conjunta da baixa temperatura e da presença de lâmina de água sobre a emergência dos genótipos de arroz e, mesmo sendo tolerante nas demais temperaturas o genótipo ITJ03 apresentou drástica redução na capacidade de tolerar o alagamento na temperatura de 20 °C.

Os genótipos de arroz demonstraram redução no comprimento da parte aérea (CPA) em temperatura de 20 °C e ausência de lâmina de água, quando comparados às mesmas condições e temperatura de 25 °C (Tabela 4). O menor CPA, bem como menor emergência, pode ser reflexo da baixa temperatura, pois esta influencia na fase de ativação e crescimento do coleóptilo e radícula, sendo que a temperatura ideal para o desenvolvimento do arroz nesta fase é situada entre 25 e 30 °C (Yoshida, 1981; Sartori *et al.*, 2014). A temperatura de 20 °C é considerada limitante e provoca alterações na expressão das enzimas esterase e álcool desidrogenase, que estão envolvidas na germinação e emergência das sementes (Mertz *et al.*, 2009; Sartori, *et al.*, 2014). A álcool desidrogenase (ADH) é uma enzima envolvida na fermentação alcoólica e responsiva ao frio, indicando que esse estresse induz a fermentação e a produção de etanol (Kato-Noguchi & Yasuda, 2007). Neste caso, o etanol é conhecido por prevenir a degradação de lipídios em membranas e por promover o aumento na fluidez das membranas, proporcionando a adaptação das plântulas a baixas temperaturas. Contudo, a ADH também é estimulada sob condições de alagamento podendo estar envolvida na resposta a ambos os estresses de forma concomitante.

TABELA 4. Comprimento de parte aérea (CPA) de genótipos de arroz em diferentes temperaturas e condições de alagamento aos 28 dias após a semeadura (DAS). UFRGS, Porto Alegre – RS, 2017.

Genótipos	20 °C			25 °C			30 °C		
	Sat	5cm	10cm	Sat	5cm	10cm	Sat	5cm	10cm
Nippo.	A 25,3 β b	B 0,0 γ b	B 0,0 β a	A 43,4 α b	B 20,8 α c	B 15,9 α c	A 40,7 α c	B 8,3 β e	B 2,1 β d
IRGA417	A 27,6 β ab	B 0,0 β b	B 0,0 β a	A 41,3 α b	B 31,8 α b	C 22,3 α b	A 43,9 α c	B 28,6 α d	B 21,1 α c
ITJ03	A 31,9 β a	B 12,4 γ a	C 0,0 γ a	A 51,9 α a	B 39,7 β a	B 40,7 β a	A 55,7 α b	A 52,1 α b	A 58,5 α a
AV04	A 31,6 β a	B 1,6 β b	C 0,0 β a	A 53,5 α a	B 41,1 α a	B 42,1 α a	A 52,5 α b	A 45,8 α c	B 0,0 β d
ITJ01	A 30,9 β ab	B 0,0 γ b	B 0,0 γ a	A 49,9 β a	B 38,8 β a	B 35,6 β a	A 63,4 α a	A 60,3 α a	B 44,5 α b
CV (%)	12,65								

*Médias antecedidas por letras maiúsculas distintas, comparam nas linhas (Alagamento), letras minúsculas diferentes comparam nas colunas (Genótipos) e letras gregas comparam entre as temperaturas, dentro dos mesmos genótipos e condição de alagamento, tukey ($p \leq 0,05$).

Na presença de 5 cm de lâmina e 20 °C, a redução da CPA do genótipo de arroz daninho ITJ03 foi de 28,3 cm, quando comparado a mesma condição de alagamento e 25 °C. De forma geral, o incremento de temperatura de 25 para 30 °C não estimulou o desenvolvimento em estatura dos genótipos de arroz na condição de solo saturado. Entretanto, quando essa elevação da temperatura ocorreu na presença de 10 cm de lâmina de água apenas os genótipos ITJ03 e ITJ01 obtiveram ganhos no CPA, com incremento de 17,8 e 10,9 cm, respectivamente (Tabela 4).

A tolerância ao alagamento apresentado pelo genótipo ITJ03, a partir de trabalhos iniciais é atrelada a maior presença de transcritos dos genes *RAmy3D* e *ADH2* (Kaspary *et al.*, 2015). Esses genes codificam enzimas responsáveis respectivamente, pelo aumento na mobilização de reservas e manutenção da respiração anaeróbica, atuando concomitantemente na resposta a baixa disponibilidade de oxigênio (Ismail *et al.*, 2009; Takahashi *et al.*, 2014). De maneira similar, em cultivares de arroz tolerantes ao frio é relatada maior presença da enzima ADH (Mertz *et al.*, 2009). Portanto, o mesmo mecanismo de tolerância pode estar presente em resposta aos dois estresses. Nesse contexto, a atuação do frio e alagamento agravam os danos ao metabolismo, tornando insuficiente a atuação deste mecanismo na tolerância, não permitindo a germinação e emergência do arroz sob estas condições.

A presença de lâmina de água durante a entressafra do arroz diminui a flutuação térmica do solo, bem como altera as propriedades físico-químicas deste e resulta em impactos negativos sobre a germinação de espécies daninhas e arroz daninho (Roberts & Totterdell, 1981; Grosh *et al.*, 2017). O alagamento contínuo dos campos de cultivo com lâmina de 6 cm durante o inverno foi capaz de reduzir a infestação de arroz daninho em cerca de 30% (Singh *et al.*, 2016). A manutenção de lâminas de água mais profundas poderia evitar totalmente a capacidade de germinação e emergência de arroz daninho. Ainda nesse sentido, o preparo antecipado da área e entrada precoce da água nas áreas de cultivo, enquanto as temperaturas estiverem amenas, pode auxiliar no manejo da tolerância ao alagamento durante a germinação e o crescimento inicial do arroz daninho. Contudo, a entrada da água tardiamente e formação de lâmina de até 10 cm, não evita a emergência de arroz daninho que apresenta tolerância ao alagamento durante a germinação e crescimento inicial.

3.3.4 IV - Influência da pálea e lema e, da profundidade do solo na tolerância ao alagamento em arroz daninho

A análise de variância para os resultados obtidos não demonstrou interação significativa do fator presença de lema e pálea com os demais. Desse modo, nova análise foi realizada para os fatores profundidade de semeadura x lâmina de água x genótipos de arroz, na qual observou-se interação tripla significativa, e assim, os resultados foram ajustados segundo o modelo logístico de três parâmetros $Y = a / (1 + (X + X_{0.50})^b)$ (Figuras 3 e 4).

A avaliação da emergência realizada aos sete DAS demonstrou diferença na velocidade de emergência entre os genótipos avaliados. O genótipo ITJ03 apresentou emergência superior a 80% para as profundidades de semeadura até 1,0 cm e condição solo saturada, enquanto que o genótipo ITJ01 nas mesmas condições obteve emergência em torno de 60% (Figura 3A). No mesmo período, na presença de lâmina de água de 5,0 e 10 cm, a semeadura sob o solo permitiu maiores índices de emergência para todos os genótipos

utilizados (Figura 3 C e E). Novamente o genótipo de arroz daninho ITJ03 obteve o melhor desempenho quando semeado a 0,25 cm de profundidade e sob 10 cm de lâmina de água apresentando emergência de 33,0%, sendo que nesta condição todos demais genótipos de arroz não obtiveram emergência.

Aos 14 DAS a semeadura até 2 cm de profundidade não alterou o comportamento genótipos avaliados, havendo apenas diferenças entre os acessos utilizados para a variável emergência quando em solo saturado (Figura 3B). Entretanto, quando semeados em 8 cm de profundidade a emergência máxima obtida foi de 30% na ausência de lâmina de água e totalmente inibida nas condições de 5 e 10 cm de alagamento (Figura 3D e F). Portanto, o efeito da lâmina de água é potencializado em sementes de arroz daninho enterradas na comparação com aquelas em superfície.

A emergência avaliada 21 dias após a semeadura (DAS) demonstrou desempenho próximo a 80% para todos os genótipos avaliados na ausência de lâmina de água e com semeadura em até 4 cm de profundidade (Figura 4A). Contudo, mesmo sem presença de lâmina de água, a emergência aos 21 DAS foi comprometida quando realizado a semeadura a 8 cm de profundidade, atingindo aproximadamente 10% para os genótipos Nippombare, IRGA 417 e ITJ01 e 30% para o ITJ03 e AV04 (Figura 4A). Em estudo semelhante a redução da emergência em função da profundidade das sementes atingiu 80% quando diferentes acessos de arroz daninho asiáticos foram submetidos a profundidades de solo de 10 cm (Ghosh *et al.*, 2017). Deste modo, a profundidade em que as sementes se encontram pode comprometer significativamente o potencial de germinação e o crescimento inicial do arroz daninho.

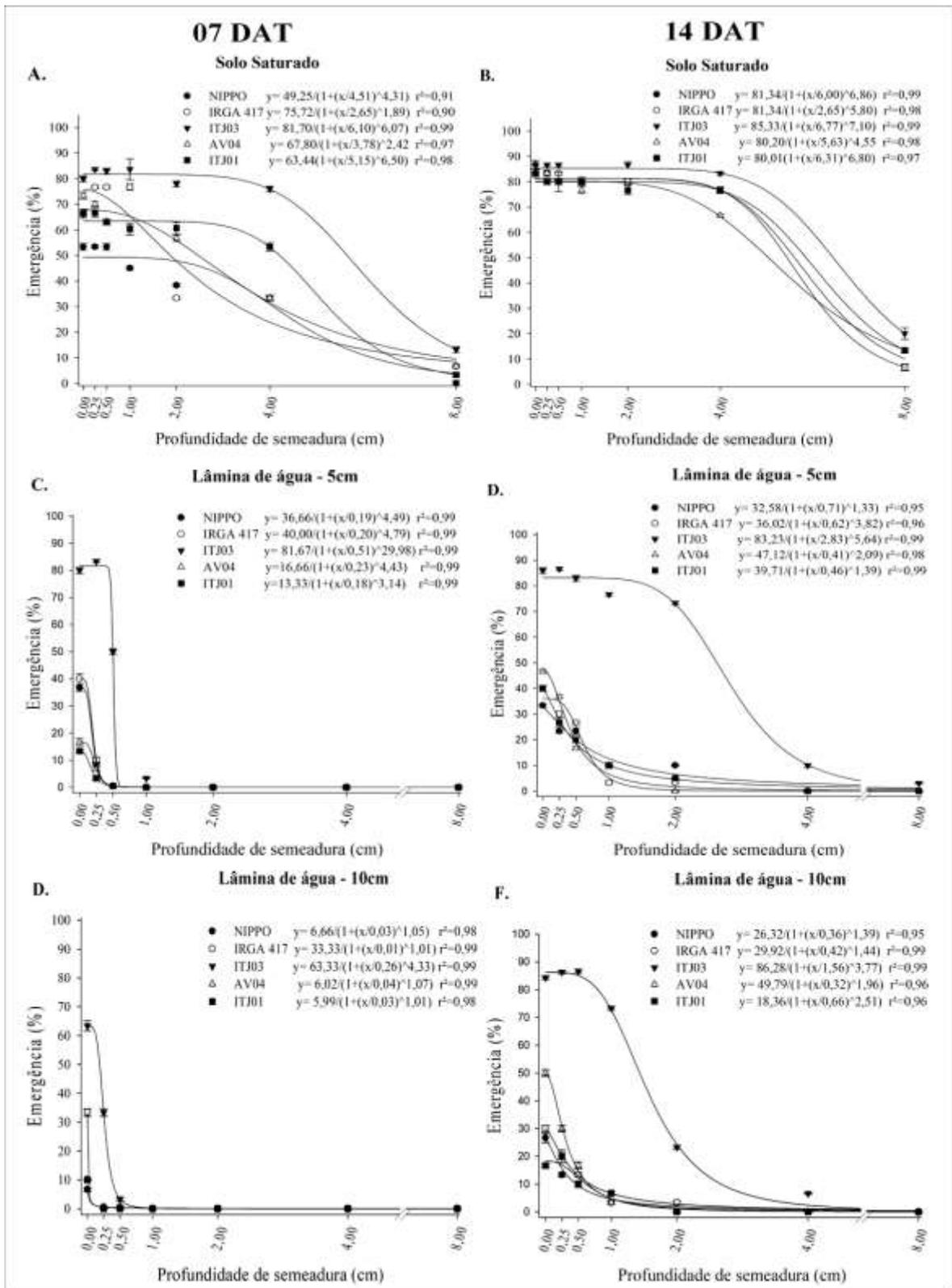


FIGURA 3. Emergência aos sete (A, C e F) e 14 (B, D e G) dias após a semeadura (DAS) em genótipos de arroz submetidos a diferentes lâminas de água e profundidade de semeadura. Os gráficos foram plotados com a média de quatro repetições e as barras verticais indicam o intervalo de confiança ($\alpha = 0,05$). UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil, 2017.

A presença de lâmina de água reduziu a emergência dos genótipos não tolerantes ao alagamento (Figura 4C e 4D). Na presença de 5 cm de lâmina de água e com semeadura sobre o solo, os genótipos AV04, ITJ01 e Nipponbare apresentaram emergência de 56,6; 43,3 e 38,3%, respectivamente. Contudo, estes mesmos genótipos obtiveram emergência inferior a 10% quando semeados a 2 cm de profundidade e sob 5 cm de lâmina de água. Nesse cenário, o genótipo ITJ03 teve emergência de 88,5; 88,6; 88,3; e 13,3% para as profundidades de semeadura 0,0; 0,25; 0,5 e 8,0 cm, respectivamente. Em estudo similar, lâmina de água de 5 cm foi capaz de reduzir em até 100% a emergência de arroz daninho semeado em profundidade de 1 cm (Ghosh *et al.*, 2017).

Na avaliação da emergência dos genótipos de arroz submetidos a 10 cm de lâmina de água, apenas o ITJ03 demonstrou ser tolerante à condição obtendo desempenho superior a 70% até a profundidade de semeadura de 1 cm (Figura 4F). Contudo, para as profundidades de semeadura de 4,0 e 8,0 cm a emergência desse genótipo foi de apenas 41,5 e 4,6%, respectivamente. Enquanto o genótipo AV04 obteve 50% de emergência quando semeado sobre a superfície do solo e sob 10 cm de lâmina de água. Os demais genótipos apresentaram resultados inferiores a 30% para semeadura sobre o solo e, quando as sementes foram posicionadas a 2 cm ou mais de profundidade a emergência não ocorreu (Figura 4F).

Sementes de acessos distintos de arroz daninho posicionadas sobre o solo não tiveram redução na taxa de emergência quando submetidas a lâminas de água de até 8,0 cm (Chauhan, 2012). Este resultado indica que a quantidade de oxigênio difundida na água pode ser o suficiente para promover a germinação e o crescimento inicial de arroz daninho com diferencial adaptabilidade ao alagamento. Entretanto, os mesmos genótipos quando enterrados a 2 cm apresentaram emergência em torno de 40%, evidenciando o efeito cumulativo do enterrio e lâmina de água sobre a emergência de arroz (Chauhan, 2012). Nesse contexto, a redução da emergência do arroz é efeito da redução da quantidade de oxigênio

disponível para a germinação, pois a difusão desse elemento para camadas de solo mais profundas e sob alagamento é restrita (Chen *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2015).

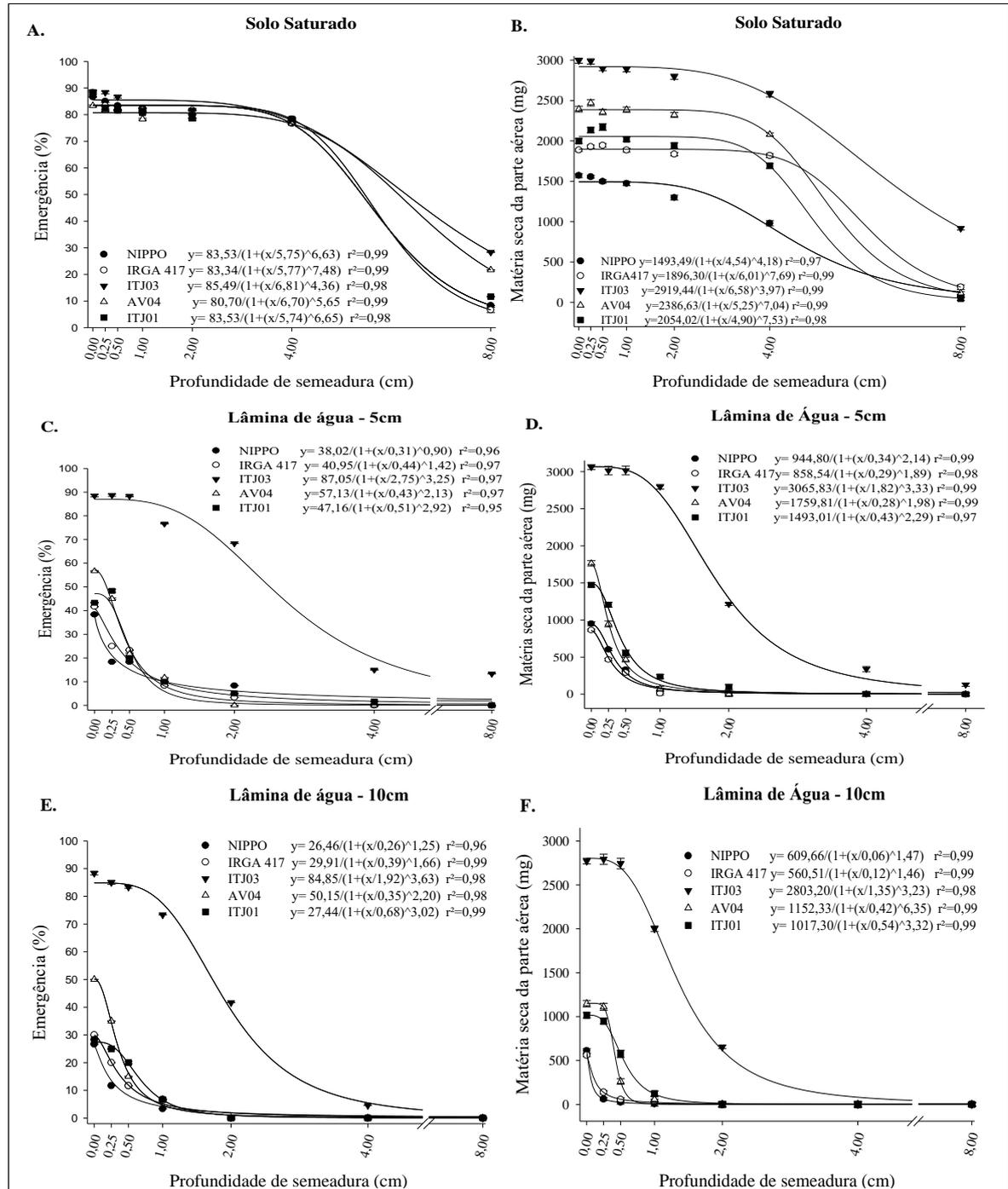


FIGURA 4. Emergência (A, C e F) e matéria seca da parte aérea (B, D e G) em genótipos de arroz submetidos a diferentes lâminas de água e profundidade de sementeira, avaliado aos 21 dias após a sementeira. Os gráficos foram plotados com a média de quatro repetições e as barras verticais indicam o intervalo de confiança ($\alpha = 0,05$). UFRGS, Porto Alegre, 2017.

O acúmulo de MSPA dos genótipos de arroz apresentou comportamento similar ao observado para a emergência, com desempenho superior na condição de solo saturado, mantendo-se estável até a profundidade de 2 cm (Figura 4B). No entanto, mesmo na ausência de lâmina de água, a redução da MSPA foi superior a 50% em todos os genótipos quando estes foram semeados a 8 cm de profundidade. O genótipo de arroz daninho ITJ03 demonstrou elevada capacidade de suportar a presença de 5 cm de lâmina de água, mantendo o MSPA próximo ao desempenho das plantas sem alagamento para profundidades de semeadura de até 1,0 cm (Figura 4D). Os demais genótipos, para mesma condição apresentaram elevada redução do acúmulo de MSPA, demonstrando não serem tolerantes ao alagamento.

Apesar de ser caracterizado como tolerante à condição de hipóxia, o genótipo ITJ03 apresentou menor acúmulo de MSPA quando semeado em profundidades superiores e na presença de 5 cm de lâmina de água, atingindo reduções de 60, 89 e 96% para as profundidades 2,0; 4,0 e 8,0 cm, respectivamente. Estes resultados corroboram os descritos para genótipos de arroz daninho asiáticos que apresentaram redução superior a 90% quando semeados a 1,0 cm de profundidade e sob 8 cm de lâmina de água (Chauhan, 2012). Para a condição de semeadura profunda, mas sem presença de lâmina de água é relatada em genótipos tolerantes a atuação da enzima ADH (Malone *et al.*, 2007). De modo semelhante a expressão do gene *ADH* é associada à tolerância ao alagamento na germinação em arroz cultivado (Ismail *et al.*, 2009). Portanto, o mesmo mecanismo pode estar presente no genótipo ITJ03 e em sua resposta a grandes profundidades e ao alagamento, uma vez que ambos dificultam o acesso ao oxigênio.

A presença de lâmina de água com 10 cm acarretou intensa redução do acúmulo de MSPA, principalmente para profundidades de semeaduras superior a 1 cm e genótipos não tolerantes ao alagamento durante a germinação e o crescimento inicial (Figura 1G). Nesse

contexto, apenas o genótipo ITJ03 manteve seu potencial de acúmulo de MSPA frente à presença de 10 cm de lâmina de água e semente em profundidade de até 0,50 cm e redução de 27,78% quando semeado a 1,0 cm. O arroz daninho AV04, apesar de apresentar mediana tolerância ao alagamento, demonstrou acúmulo de MSPA próximo a zero em semeadura em 1 cm de profundidade. No mesmo sentido, as duas cultivares de arroz não foram capazes de suportar a presença de lâmina de água de 10 cm durante a emergência, mesmo para semeadura em superfície a redução da MSPA próxima a 70% quando comparado ao solo saturado, para Nipponbare e IRGA 417.

O menor acúmulo de MSPA pode ser resultante do maior consumo de energia durante o processo de emergência provocado pela presença do alagamento. Neste contexto, o genótipo ITJ03 caracterizado como tolerante apresentou desempenho mais estável frente ao estresse ao qual foi submetido e, provavelmente conta com mecanismo de resposta ao alagamento que permite o seu desenvolvimento e/ou fuga da lâmina de água com menores perdas em seu desenvolvimento (Hattori, *et al.*, 2009). Entretanto, o efeito somado da presença de lâmina de água e profundidade da semente no solo atrelada a menor difusão de oxigênio a maiores profundidades do solo exige maior capacidade dos genótipos em tolerar a baixa disponibilidade de oxigênio. Esses dois fatores somados poderão ser utilizados no manejo do arroz daninho, em especial os com menor tolerância ao alagamento.

3.5 Conclusões

A utilização de lâminas de água de 5 e 10 cm foi eficiente para discriminar genótipos de arroz daninho de média e elevada tolerância à submersão durante a germinação e o crescimento inicial. A seleção de genótipos de arroz daninho ao alagamento indicou a existência de variabilidade entre os 158 acessos avaliados, onde um e 13 genótipos são

altamente e medianamente tolerantes a submersão, respectivamente. Em condição de 20 °C de temperatura e presença de 10 cm de lâmina de água não houve emergência de arroz daninho tolerante à submersão, mas em temperaturas de 25 e 30 °C a emergência foi superior a 90% para o genótipo tolerante. Ainda, quando em profundidades superiores a 2 cm e sob 10 cm de lâmina de água não ocorreu germinação dos genótipos de arroz, indicando o efeito cumulativo dos dois fatores. Sendo assim, lâmina de água de 10 cm quando associadas a baixa temperatura e/ou profundidade de solo superior a 2 cm é capaz de evitar a emergência de arroz daninho. Estas informações são importantes para a composição de práticas de manejo da lavoura como época e profundidade de preparo do solo em arroz cultivado no sistema de semeadura em solo seco, e de lâmina de água durante o preparo do solo e lâmina de água a ser mantida durante o desenvolvimento da lavoura em arroz cultivado nos sistemas pré-germinado e transplante.

3.6 Referências

- AGOSTINETTO, D. *et al.* Arroz vermelho: ecofisiologia e estratégias de controle. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 31, n. 2, p. 341-349, 2001.
- ANGAJI, S.A. *et al.* QTLs associated with tolerance of anaerobic conditions during germination in rice (*Oryza sativa* L.). **Euphytica**, Wageningen, v. 172, n. 2, p. 159-168, 2010.
- AVILA, L.A.D. *et al.* Banco de sementes de arroz vermelho em sistemas de semeadura de arroz irrigado. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 30, n. 5, p. 773-777, 2000.
- BALBINOT JUNIOR, A.A. *et al.* Competitividade de cultivares de arroz irrigado com cultivar simuladora de arroz-vermelho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 1, p. 53-59, 2003.
- BORJAS, A.H. *et al.* Genetic analysis of germinating ability and seedling vigor under cold stress in US weedy rice. **Euphytica**, Wageningen, v. 208, n. 2, p. 251-264, 2016.
- CHAUHAN, B.S. Weedy rice (*Oryza sativa*) II. Response of weedy rice to seed burial and flooding depth. **Weed Science**, Champaign, Ill., v. 60, n. 3, p. 385-388, 2012.
- CHAUHAN, B.S; JOHNSON, D.E. Ecological studies on *Cyperus difformis*, *Cyperus iria*

and *Fimbristylis miliacea*: three troublesome annual sedge weeds of rice. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 155, n. 1, p. 103–112, 2009.

CHEN, X.P. *et al.* Ammoniaoxidizing archaea: important players in paddy rhizosphere soil? **Environ Microbiology**, Oxford, v. 10, n. 8, p. 1978–1987, 2008.

DELOUCHE, J.C. *et al.* **Weedy rices-origin, biology, ecology, and control**. Rome: FAO, 2007. 144 p.

FUKAO, T. *et al.* A variable cluster of ethylene response factor-like genes regulates metabolic and developmental acclimation responses to submergence in rice. **Plant Cell**, Rockville, v. 18, n. 8, p. 2021-2034, 2006.

GHOSH, D. *et al.* Impact of burial and flooding depths on Indian weedy rice. **Crop Protection**, Guildford, v. 100, n. 3, p. 106-110, 2017.

HATTORI, Y. *et al.* The ethylene response factors *SNORKEL1* and *SNORKEL2* allow rice to adapt to deep water. **Nature**, London, v. 460, n. 7258, p. 1026-1031, 2009.

HSU, S.; TUNG, C. Rna-Seq analysis of diverse rice genotypes to identify the genes controlling coleoptile growth during submerged germination. **Frontiers Plant Science**, Lausanne, v. 8, n. 762, p. 1-15, 2017.

ISMAIL, A.M. *et al.* Mechanisms associated with tolerance to flooding during germination and early seedling growth in rice (*Oryza sativa*). **Annals of Botany**, Oxford, v. 103, n. 2, p. 197–209, 2009.

ISMAIL, A.M. *et al.* Adaptation to flooding during emergence and seedling growth in rice and weeds, and implications for crop establishment. **AoB Plants**, Oxford, v. 2012, pls019, 2012.

KASPARY, T. E. *et al.* **Determinação de método diagnóstico para tolerância de arroz vermelho à submersão**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ARROZ IRRIGADO, 9.; 2015, Pelotas. **Anais...** Pelotas: [s.n.], 2015. Disponível em: <http://www.cbai2015.com.br/anais/index.php?secao=trabalhos&acao=view&id_trabalho=285>. Acesso em: 06 maio. 2017.

KATO-NOGUCHI, H.; YASUDA, Y. Effect of low temperature on ethanolic fermentation in rice seedlings. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 164, n. 8, p. 1013-1018, 2007.

KLUDZE, H. K.; DeLAUNE, R. D. Straw application on methane and oxygen exchange and growth in rice. **Soil Science Society of American Journal**, Madison, v. 59, n. 3, p. 824-830, 1995.

LUXMOORE R.J. *et al.* Oxygen diffusion in the soil plant system. I. A model. **Agronomy Journal**, Auburn, v. 62, n. 1, p. 317:322, 1970.

MALONE, G. *et al.* Expressão diferencial de isoenzimas durante o processo de germinação de sementes de arroz em grandes profundidades de semeadura. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 29, n. 1, p. 61-67, 2007.

ROBERTS, E.H.; TOTTERDELL, S. Seed dormancy in *Rumex* species in response to environmental factors. **Plant Cell Environ**, Rockville, v. 4, n. 2, p. 97-106, 1981.

SINGH, V. *et al.* Herbicide and winter flood treatments for controlling volunteer riceoff-season. **Crop Protection**, Guildford, v. 79, n. 1, p. 87–96, 2016.

TAKAHASHI, H. *et al.* Rice alcohol dehydrogenase 1 promotes survival and has a major impact on carbohydrate metabolism in the embryo and endosperm when seeds are germinated in partially oxygenated water. **Annals of Botany**, Oxford, v. 113, n. 5, p. 851–859, 2014.

THEISEN, G.; ANDRES, A. **Diferenças entre espécies de ervilhaca (*Vicia sativa* e *Vicia villosa*) quanto à sensibilidade aos herbicidas utilizados para seu controle em trigo**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2010. p. 4.

WANG, B. *et al.* Differential contributions of ammonia oxidizers and nitrite oxidizers to nitrification in four paddy soils. **The ISME Journal**, Wageningen, v. 9, n. 1, p. 1062–1075, 2015.

YOSHIDA, S. **Fundamental of rice crop science**. Los Baños: International Rice Research Institute, 1981. 269 p.

4 CAPÍTULO II

Expressão de genes relacionados a tolerância à submersão durante a emergência e o crescimento inicial em arroz daninho

EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS A TOLERÂNCIA À SUBMERSÃO DURANTE A EMERGÊNCIA E O CRESCIMENTO INICIAL EM ARROZ DANINHO

RESUMO

A evolução do arroz daninho à tolerância ao alagamento durante o seu crescimento inicial pode estar relacionada a adaptações metabólicas decorrentes da expressão de genes responsivos à restrita disponibilidade de oxigênio. O objetivo deste trabalho foi analisar a expressão de genes relacionados com a tolerância à submersão, e investigar o efeito da temperatura sobre os genes de maior expressão em resposta ao alagamento na germinação e o crescimento inicial de arroz daninho. Foram realizados experimentos com as cultivares de arroz IRGA 417 e Nipponbare, sensíveis ao alagamento, e os genótipos de arroz daninho ITJ03 e AV04, que apresentam elevada e intermediária tolerância ao alagamento, respectivamente, em condições de solo úmido e submerso com 10 cm de lâmina de água, e sob condições de temperaturas de 20, 25 e 30 °C. A expressão de genes relacionados a mobilização de reservas, respiração anaeróbica e as estratégias de escape e quiescência foi analisada em períodos até 24 dias após a semeadura (DAS). Na condição de alagamento, a elevação da expressão relativa dos genes *RAmy3D* e *OsTPP7* aos quatro DAS foi 31 e 47 vezes superior, respectivamente, para o genótipo de arroz daninho ITJ03, que é tolerante ao alagamento. A expressão do gene *ADH2* não foi induzida pelo alagamento no genótipo AV04 no período de 1 DAS, mas foi 63 vezes superior no genótipo ITJ03 sob as mesmas condições. No mesmo contexto, o genótipo ITJ03 teve a expressão do gene *SNRK1* 63 vezes superior na condição de alagamento um dia após a semeadura. A temperatura de 20 °C reduziu a expressão dos genes *RAmy3D*, *ADH2* e *SNRK1* na parte aérea e radicular de todos os genótipos avaliados. A expressão relativa dos genes *RAmy3D*, *OsTPP7*, *ADH1*, *ADH2* e *SNRK1* foi induzida pela submersão no genótipo de arroz daninho tolerante, indicando a participação destes genes na tolerância ao alagamento durante a germinação e o crescimento inicial, corroborando o observado em cultivares de arroz tolerante. Por outro lado, os genes *SUB1* e *PDC1*, que são importantes para a tolerância a esse estresse em arroz cultivado, apresentaram baixa associação em arroz daninho. A condição de baixa temperatura reduz a expressão dos genes relacionados a tolerância ao alagamento, acentuando o efeito da presença da lâmina de água sobre a capacidade de germinação e estabelecimento do arroz daninho.

GENE EXPRESSION RELATED TO FLOODING TOLERANCE DURING GERMINATION AND EARLY GROW OF WEEDY RICE

ABSTRACT

The evolution of weedy rice to flooding tolerance during germination and initial growth may be related to metabolic adaptations resulting from the expression of genes responsive to the restricted availability of oxygen. The objective of this study was analyze the expression of genes related to flooding tolerance and investigate the effect of temperature on genes of higher expression in response to this stress in the initial establishment of weedy rice. The experiments were carried out with rice cultivars IRGA 417 and Nipponbare, susceptible to flooding, and the weedy rice ITJ03 and AV04, which presented high and intermediate tolerance to flooding, respectively, under moist and submerged soil with 10 cm of flooding depths, and under temperatures of 20, 25 and 30 °C. Expression of genes related to reserve mobilization, anaerobic respiration and escape and quiescence strategies were analyzed at periods up to 24 days after sowing (DAS). In the flooding condition, the relative expression of *RAmy3D* and *OsTPP7* genes at four DAS was 31 and 47 times higher for the ITJ03, which is tolerant to flooding. Expression of the *ADH2* gene was not induced by flooding in the AV04 genotype at one DAS period, but was 63 fold higher in the ITJ03 genotype under the same conditions. In the same context, the ITJ03 ecotype had the *SNRK1* gene expression 63 times higher in the flooding condition one day after sowing. The temperature of 20 °C reduced the expression of the *RAmy3D*, *ADH2* and *SNRK1* genes in the shoots and roots in all evaluated genotypes. The relative expression of the genes *RAmy3D*, *OsTPP7*, *ADH1*, *ADH2* and *SNRK1* was induced by submersion in the tolerant weedy rice genotype, indicating the participation of these genes in the tolerance to flooding during germination and initial growth, corroborating with that observed in tolerant rice cultivars. Otherwise, the *SUB1* and *PDC1* genes that are important for the tolerance to this stress in cultivated rice presented low effect in weedy rice. The low temperature condition reduces the expression of genes related to flood tolerance and increase the effect of high flooding depth on the germination and establishment of weedy rice.

4.1 Introdução

O arroz daninho ou vermelho (*Oryza sativa* L.) é a principal planta daninha do arroz cultivado devido a sua proximidade biológica, elevada adaptabilidade a diferentes práticas agronômicas, emergência vigorosa e desenvolvimento sincronizado com a cultura, que resultam na dificuldade de seu controle. A inundação contínua da área, estratégia amplamente utilizada nos sistemas de cultivo de transplante e de sementes pré-germinadas, é a prática mais eficiente no controle dessa espécie daninha, pois o arroz daninho e cultivado, são sensíveis a condições de baixa disponibilidade de oxigênio durante a germinação e o crescimento inicial (Ismail *et al.*, 2009; Angaji *et al.*, 2010). O sistema pré-germinado é amplamente utilizado no cultivo de arroz, no qual o uso contínuo da lâmina de água resultou recentemente na evolução de genótipos de arroz daninho com capacidade de tolerar o alagamento no seu estabelecimento (Capítulo I). Esses genótipos são capazes de germinar e emergir em condições de inundação, com baixa disponibilidade de oxigênio (hipóxia).

A privação de oxigênio e a impossibilidade de obter energia por meio da via de fosforilação oxidativa é um dos principais entraves para a tolerância ao alagamento do solo em plantas (Irfan *et al.*, 2010). O potencial de germinação e o crescimento inicial do arroz sob deficiência de oxigênio é relacionado com a capacidade diferencial na obtenção de energia (ATP) via rotas anaeróbicas, ativação do metabolismo e rápido alongamento do coleótilo (Lasanthi-Kudahettige *et al.*, 2007; Hattori *et al.*, 2009; Miro & Ismail, 2013). Durante a germinação e o desenvolvimento inicial em condição de submersão, genótipos tolerantes são capazes de expressar conjuntos de genes relacionados à aclimação às condições desfavoráveis (Loreti *et al.*, 2017). As principais alterações ocorrem nas rotas de mobilização de reservas, glicólise e fermentação, de modo a ativar e manter o metabolismo energético, garantindo o estabelecimento e sobrevivência durante o período de estresse

(Voesebeck & Bailey-Serres, 2015).

A obtenção de energia no meio anaeróbico ocorre via glicólise, para a qual a elevada disponibilidade de açúcar é crucial (Loreti *et al.*, 2017). O aporte de açúcar é gerado pela maior atividade das enzimas α -amilases e sacarose sintase, que atuam sobre o catabolismo de amido e solubilização de açúcares (Kretzschmar *et al.*, 2015). Deste modo é possível a obtenção do aporte energético necessário para o início da germinação e emergência, proporcionando a tolerância ao alagamento durante o estabelecimento do arroz (Loreti *et al.*, 2016). Essas enzimas são oriundas da expressão de genes das famílias *Rice Alpha-amilase (RAmy)* e *Sucrose Synthase (SUS)* que apresentaram expressão quatro e 592 vezes superior em genótipo de arroz tolerante ao alagamento quando sua germinação é realizada sob submersão (Magneschi & Perata, 2009; Ismail *et al.*, 2009). Ainda nesse contexto, a enzima trehalose-6-phosphate phosphatase também é relacionada ao aumento da conversão de amido em glicose, elevando o aporte de substrato para a glicólise e obtenção de energia sob condição de submersão (Kretzschmar *et al.*, 2015).

A glicólise é a principal rota energética sob hipóxia e anóxia, contudo gera de forma residual moléculas de NADH^+H^+ (nicotinamida adenina dinucleotídio reduzida) que precisam ser consumidas, regenerando NAD^+ para a manutenção do metabolismo glicolítico. O consumo de NADH^+H^+ ocorre por meio da atuação das enzimas piruvato descarboxilase (PDC) e álcool desidrogenase (ADH) na fermentação etanólica, produzindo etanol (Takahashi *et al.*, 2014). Os genes que codificam essas enzimas, *PDC1* e *ADH1* foram expressos 594 e quatro vezes mais em coleótilos do genótipo de arroz tolerante ao alagamento em comparação com o arroz suscetível (Lasanthi-Kudahettige *et al.*, 2007). De forma similar, a atividade da enzima ADH é relatada na resposta ao frio durante a germinação e emergência de arroz (Mertz *et al.*, 2009; Sartori *et al.*, 2014). Deste modo, o mesmo mecanismo de tolerância pode estar envolvido na resposta a dois diferentes estresses.

As estratégias “quiescência” e “escape” são descritas como mecanismos de

tolerância ao alagamento em arroz cultivado após o seu estabelecimento (Fukao *et al.*, 2011; Loreti *et al.*, 2016). A quiescência é caracterizada pela paralisação do metabolismo da planta durante a ocorrência do alagamento, sendo o seu desenvolvimento retomado após a finalização do estresse, e mediada pelo fator de transcrição responsivo ao etileno *SUB1* (*Submergence 1*) (Fukao *et al.*, 2011). A estratégia de escape consiste o alongamento dos entrenós do colmo até a planta emergir da lâmina de água e, ocorre em resposta a atuação dos fatores de transcrição *Snorkell* e *Snorkel2* (Hattori *et al.*, 2011). A atuação dessas estratégias durante a germinação e emergência poderia conferir maior potencial de invasibilidade ao arroz daninho, permitindo seu estabelecimento na presença de lâmina de água. Entretanto, para arroz daninho não é conhecido o mecanismo envolvido na tolerância ao alagamento durante a germinação e o crescimento inicial e quais os efeitos da variação da temperatura sobre essa característica. Neste contexto, os objetivos deste trabalho foram identificar e analisar a expressão de genes relacionados com a tolerância à submersão, e investigar o efeito da temperatura sobre os genes de maior expressão em resposta ao alagamento no estabelecimento de arroz daninho.

4.2 Materiais e metodos

4.2.1 I - Identificação e expressão de genes relacionados à tolerância à submersão durante a germinação e o crescimento inicial de arroz daninho

O estudo foi conduzido em ambiente climatizado, com temperatura mantida constante em 25 °C e delineamento experimental completamente casualizado, com arranjo fatorial 4x2x8, sendo o fator A os genótipos de arroz (cultivar IRGA 417 e Nipponbare, e os genótipos de arroz daninho ITJ03 e AV04), o fator B a condição de solo úmido e submerso

(10 cm de lâmina de água) e o fator C os períodos de avaliação (0; 0,5; 1; 2; 4; 8; 16 e 24 dias após a semeadura). As cultivares de arroz e os genótipos de arroz daninho AV04 e ITJ03 foram caracterizados respectivamente como sensível, moderadamente tolerante e tolerante à submersão durante a germinação e o crescimento inicial (Capítulo I). A cultivar IRGA 417 no período zero e condição de solo úmido foi considerada a testemunha.

O delineamento experimental utilizado foi completamente casualizado com quatro repetições, sendo que cada repetição consistiu de um vaso com 18 sementes, totalizando 72 sementes por genótipo em cada tratamento. As sementes de cada genótipo, após serem submetidas a quebra de dormência com um período de cinco dias a temperatura de 50 °C, foram semeadas a 0,5 cm de profundidade em caixas plásticas de 200ml contendo solo acrescido de composto orgânico (10:1), além de fertilizante mineral e, em seguida submetidas aos referidos tratamentos. Em cada um dos períodos de avaliação amostras de tecido compreendendo o embrião e região circundante foram coletadas, imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80 °C.

O RNA total foi extraído a partir do protocolo Concert® seguindo as especificações do fabricante (Invitrogen). A concentração de RNA foi mensurada em espectrofotômetro Genesys 2 (Thermo Spectronic) e, posteriormente, as amostras foram submetidas ao tratamento com DNase I (Invitrogen), eliminando contaminantes de DNA que poderiam influenciar nas análises posteriores. A síntese de cDNA foi realizada utilizando a enzima transcriptase reversa M_MLV (Invitrogen), segundo protocolo da empresa fabricante.

Os genes de referência utilizados foram: *Fator de iniciação eucariótico-4-A (EIF4-A)*, *RNA ribossomal 18S (18S)*, *Ubiquitina-10 (UBI-10)* e *Actina (ACT)* já descritos como normalizadores para estudos de expressão relativa em arroz (Jain *et al.*, 2006; Benemann *et al.*, 2017). Os genes *Rice Alpha-amilase 3D (RAmy3D)*, *Sucrose Synthase 3 (SUS3)*, *Alcohol dehydrogenase 1 (ADH1)*, *Alcohol Dehydrogenase 2 (ADH2)*, *Pyruvate Decarboxylase 1 (PDC1)*, *SNORKEL 1 (SNRK1)*, *Trehalose-6-Phosphate Phosphatase 7*

(*OsTPP7*), *Submergence 1 (SUB1)* apresentam resposta à condição de alagamento no estabelecimento de arroz (Lasanthi-Kudahettige *et al.*, 2007; Fukao *et al.*, 2011; Hattori *et al.*, 2011; Kretzschmar *et al.*, 2015), tornando-se desta forma genes candidatos na resposta de arroz daninho à submersão (Tabela1).

TABELA 1. Genes de referência e candidatos à tolerância à submersão, sequência dos primers (5'-3') utilizados para a análise de RT-qPCR e temperatura de pareamento (Tm). UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil. 2018.

Gene	Sequência do primer (forward)	Sequência do primer (reverse)	°C
<i>RAmy3D*</i>	5'-gctcaaaccagtttctacacggc-3'	5'-gccccgcaattaacctagagg-3'	62,0
<i>SUS3</i>	5'-ttcacagctgacctgattgc-3'	5'-acttgggggtcaaagacatcg-3'	64,0
<i>ADH1</i>	5'-acgagtttcagttcgtcaccctct-3'	5'-aaccacaactcgagcgcacaaatc-3'	60,5
<i>ADH2</i>	5'-cactttgttgacatccac-3'	5'-tgagaatgcagaccttgtcg-3'	63,0
<i>PDC1</i>	5'-cgtccacaccgtctacctc-3'	5'-cctcagcacgctgtacttctg-3'	63,0
<i>SNRK1</i>	5'-gagacaccaaactcagccactg-3'	5'-atgcctcaagccaaaccag-3'	62,0
<i>OsTPP7</i>	5'-gggaggatggtgttcgag-3'	5'-agcgagtcgaggaggaact-3'	63,0
<i>SUB1A</i>	5'-acaacggcctcatcacaatc-3'	5'-caggcttcctgcatatgat-3'	62,5
<i>ELF4-A</i>	5'-ttgtgctggatgaagctgatg-3'	5'-ggaaggagctggaagatatcataga-3'	62,0
<i>18S</i>	5'-gtgacggagaattagggttc-3'	5'-tgtcaggattgggtaatttg-3'	62,0
<i>UBI-10</i>	5'-tggtcagtaatcagccagtttg-3'	5'-gcaccacaaatacttgacgaacag-3'	62,0
<i>ACT.</i>	5'-ttccaagggtgagtatgatgag-3'	5'-acacaggacacaaaagccaacta-3'	64,0

**RAmy3D*: Rice Alpha-amilase 3D, *SUS3*: Sucrose Synthase 3, *ADH1*: Alcohol Dehydrogenase 1, *ADH2*: Alcohol Dehydrogenase 2, *PDC1*: Pyruvate Decarboxylase 1, *SNRK1*: SNORKEL 1, *OsTPP7*: Trehalose-6-Phosphate Phosphatase 7, *SUB1*: Submergence 1, *ELF4-A*: Fator de iniciação eucariótico-4-A, *18S*: RNA ribossomal 18S, *UBI-10*: Ubiquitina-10, *ACT*: Actina.

As sequências de nucleotídeos de cada gene foram obtidas por meio do NCBI

(National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Com o auxílio do programa BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) foi realizado o alinhamento de sequências para a identificação das regiões mais conservadas de cada gene em outras espécies vegetais. A partir dessas sequências foi realizada a confecção de primers com auxílio do programa Primer3Plus (<<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>>).

As reações de RT-qPCR (reverse transcription - quantitative *polimerase chain reaction*) foram realizadas em Termociclador 7300 Real Time Systems (Applied Biosystems) seguindo as condições: 50 °C por 2 min; 95 °C por 10 min; 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos, 62 °C a 65 °C (dependendo do par de *primer*) por 1 min e 72 °C por 30 s. Os níveis de expressão dos genes endógenos e alvos foram analisados em triplicatas de cada uma das 4 repetições biológicas. Concomitantemente, uma amostra em branco (apenas água) foi utilizada para descartar contaminação e as curvas de dissociação confirmaram a especificidade da amplificação.

A estabilidade dos genes referência foi avaliada a partir dos valores de Ct (cycle threshold) obtidos na reação de RT-qPCR (Wang *et al.*, 2015), utilizando a ferramenta RefFinder (Xie *et al.*, 2012) (<http://fulxie.0fess.us/?ckattempt=1>), que integra os programas computacionais geNorm, Normfinder, BestKeeper e método Ct, para comparar e ranquear genes de referência. A classificação mais abrangente do coeficiente de estabilidade fornecida pelo programa foi utilizada para a escolha dos genes normalizadores. Para os genes candidatos foram calculadas a média, desvio padrão e o intervalo de confiança dos valores de Ct de cada tratamento.

O ajuste das curvas de amplificação e eficiência da RT-qPCR foi realizada através do software LinRegPCR v.12.2. Valores de $R > 0,99$, com eficiência entre 1,8 e 2 e números de pontos maiores que 4 foram aceitos (Tuomi *et al.*, 2010). Por sua vez, a análise de expressão relativa foi realizada através da equação Dussault & Pouliot (2006), onde o $\Delta\Delta Ct$

= $(C_{t_{\text{alagado}}} - C_{t_{\text{referência}}}) - (C_{t_{\text{controle}}} - C_{t_{\text{referência}}})$, sendo o $\Delta\Delta C_t$ a expressão relativa do gene, e a aplicação do resultado em $2^{-(\Delta\Delta C_t)}$ fornece a dimensão de variação. O valor de $C_{t_{\text{referência}}}$ foi determinado pela média dos genes de referência que apresentaram menores coeficientes na análise de estabilidade realizada no programa computacional RefFinder.

4.2.2 II – Efeito da temperatura sobre a expressão de genes relacionados a tolerância à submersão em arroz daninho

O estudo foi conduzido em câmaras de crescimento (BDR16 - Conviron) com ambiente climatizado e em delineamento experimental completamente casualizado, com arranjo fatorial 3x2x5, sendo o fator A as temperaturas de 20, 25 e 30 °C, o fator B a presença de lâmina de água (10,0 cm acima do solo) e ausência (testemunha com solo saturado); fator C referente aos 4 genótipos de arroz (cultivares Nipponbare e IRGA 417 e os genótipos de arroz daninho ITJ03 e AV04). Em trabalho prévio, as cultivares de arroz e os genótipos de arroz daninho ITJ03 e AV04 foram caracterizados como sensíveis, tolerante e mediantemente tolerante ao alagamento durante seu estabelecimento, respectivamente (Capítulo I). Foram utilizadas quatro repetições para cada tratamento, onde cada repetição consistiu em 10 sementes, totalizando 40 sementes de cada genótipo por tratamento. O preparo das sementes e semeadura foram realizados conforme descrito para o estudo I.

A coleta de tecido vegetal da parte aérea e radicular foi realizada separadamente aos 14 dias após a semeadura (DAS), sendo estas imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80 °C. A extração, quantificação e purificação do RNA, bem como a síntese de cDNA foi realizada como descrita para o estudo I. Os genes candidatos utilizados foram o *RAmy3D*, *ADH2* e *SNRK1* e os genes referência foram o *18S*, *ACT*, *UBI-10* e *ELF4-A* (Tabela 1). A cultivar IRGA 417 na temperatura de 20 °C e condição de solo saturado foi considerado a condição controle para os cálculos de expressão relativa. A estabilidade dos genes de referência e a expressão relativa dos genes candidatos foram calculados como

descrito para o estudo I.

4.3 Resultado e discussão

4.3.1 I - Identificação e expressão de genes relacionados à tolerância à submersão durante a germinação e o crescimento inicial de arroz daninho

4.3.1.1 Análise de estabilidade de genes referência

A amplificação dos genes referência em todos os tratamentos avaliados (genótipos de arroz x lâmina de água x períodos de coleta) demonstrou que o gene 18S apresenta maior quantidade de transcritos a partir de menor número de ciclos na reação de *PCR* em tempo real, resultando em elevada presença constitutiva. Os Cts médios observados foram 16,07; 20,97; 27,26 e 37,23 para os genes de referência *18S*, *Ubiquitina-10*, *Actina* e *ELF4-a*, respectivamente (Figura 1A). A amplitude de variação do Ct dos genes 18S e Ubiquitina - 10 demonstraram menor variação, resultando menor amplitude do intervalo de confiança e maior estabilidade frente aos tratamentos em que foram avaliados.

A estabilidade dos genes de referência, aferida pelo programa computacional RefFinder, indicou maior estabilidade do gene *18S* para os tratamentos utilizados neste estudo (Figura 1B, 1C, 1D, 1E e 1F). A análise de estabilidade obtida pelo cálculo do Delta Ct demonstrou maior coeficiente de estabilidade para o gene *18S e UBI-10*, enquanto o gene *ELF4-A* e a *ACT* demonstraram desempenho inferior com valores respectivos de 2,6250, 2,6460, 2,9730 e 3,4740 (Figura 1B). Os genes que apresentam os menores valores para os coeficientes de estabilidade são menos influenciados pelos tratamentos utilizados no estudo, tornando-se mais estável e indicados como normalizadores para a utilização em análise de expressão relativa (Xie *et al.*, 2012).

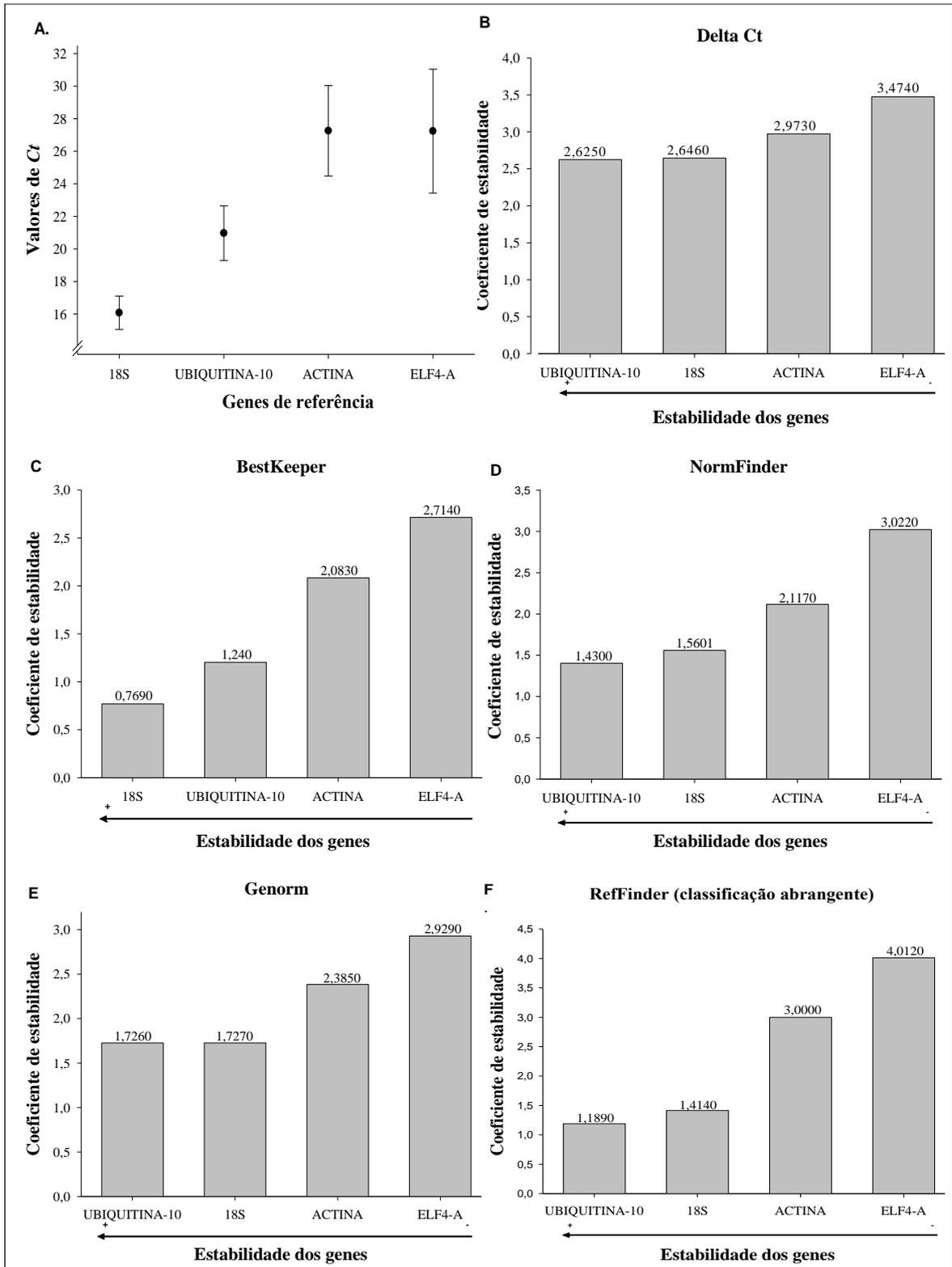


FIGURA 1. Valores de Ct (A) e Coeficiente de estabilidade obtidos a partir dos programas computacionais Delta Ct (B), BestKeeper (C), NormFinder (D) e geNorm (E) e RefFinder (F) para quatro genes referência para arroz e arroz daninho (*Oryza sativa* L.) submetidos a submersão durante a germinação e o crescimento inicial. Quanto menor o valor do coeficiente, maior a estabilidade do gene. UFRGS, Porto Alegre - RS, Brasil. 2018.

A verificação da estabilidade dos genes normalizadores realizada pelos algoritmos BestKeeper, NormFinder, Genorm e RefFinder demonstraram desempenho similar e superior para os genes *18S* e *UBI-10* (Figura 1C, D, E e F). Em estudo com arroz daninho sob competição e diferencial doses de nitrogênio os genes *18S* e *UBI-10* também apresentaram desempenho satisfatório, sendo indicados como normalizadores para trabalhos de expressão diferencial em relação ao efeito de nitrogênio (Benemann *et al.*, 2017).

Análises de expressão relativa necessitam a utilização de dois genes para a normalização dos valores obtidos pois diminuem o desvio padrão e melhoram a visualização das diferenças na expressão dos genes alvo (Nakayama *et al.*, 2014). Desse modo, a partir da avaliação de estabilidade, os genes *18S* e *UBI-10* foram escolhidos para a normalização da expressão relativa dos genes candidatos envolvidos com a tolerância ao alagamento no estabelecimento de arroz daninho.

4.3.1.2 Análise de expressão de genes relacionados com a mobilização de reservas durante a germinação e o crescimento inicial

Os genes relacionados com a mobilização de reservas, *Rice α -amylase 3D* (*RAmy3D*), *Sucrose Synthase 3* (*SUS3*) e *Trehalose-6-Phosphate Phosphatase 7* (*OsTPP7*), durante a germinação e o crescimento inicial de arroz sob condição de submersão demonstraram comportamento distintos quanto aos genótipos avaliados, ao período de avaliação e a condição de alagamento ou saturação do solo (Figuras 2, 3 e 4). O gene *RAmy3D* apresentou incremento de expressão na condição de alagamento já para o período de 0,5 DAS em todos os genótipos de arroz avaliados, mas com amplitudes diferenciadas, na comparação com a condição padrão, cultivar IRGA 417 na condição não alagada e tempo zero (Figura 2).

A expressão relativa de *RAmy3D* apresentou incremento significativo para a cultivar Nipponbare em todos os períodos e condições avaliadas, demonstrando não ser responsivo ao

alagamento nesse genótipo (Figura 2D). Enquanto a cultivar IRGA 417 não apresentou incremento diferenciado para as condições de alagamento e solo saturado (Figura 2A). Esse comportamento indica que ambas as cultivares, caracterizadas como suscetíveis ao alagamento durante o estabelecimento, não apresentam como mecanismo de tolerância à submersão o aumento da expressão de *RAmy3D*.

O genótipo de arroz daninho tolerante ao alagamento durante a germinação e emergência, ITJ03 apresentou expressão relativa de *RAmy3D* 7; 23; 20; 31; 10 e 9 vezes superior a testemunha aos 0,5; 1; 2; 4; 8 e 16 DAS, respectivamente (Figura 2B). A indução na expressão relativa do gene *RAmy3D* também é relatada em cultivares de arroz tolerantes à submersão, sendo até 592 vezes superior a sensível, oito dias após a semeadura (Lasanthi-Kudahettige *et al.*, 2007). Já o genótipo de arroz daninho AV04, que tem tolerância intermediária ao alagamento, demonstrou incremento inferior na expressão de *RAmy3D* na comparação com o ITJ03, mas obteve aumento significativo quando comparado a cultivar IRGA 417 nos períodos de 2, 4 e 8 DAS, com valores respectivos de 5; 4 e 6 vezes (Figura 2C). Deste modo, aumento dos transcritos de *RAmy3D* corrobora a diferencial capacidade de estabelecimento dos genótipos AV04 e ITJ03, que sob 10 cm de lâmina de água apresentam 30 e 80% de emergência, sendo caracterizados como genótipos de média e elevada tolerância à submersão (Capítulo I).

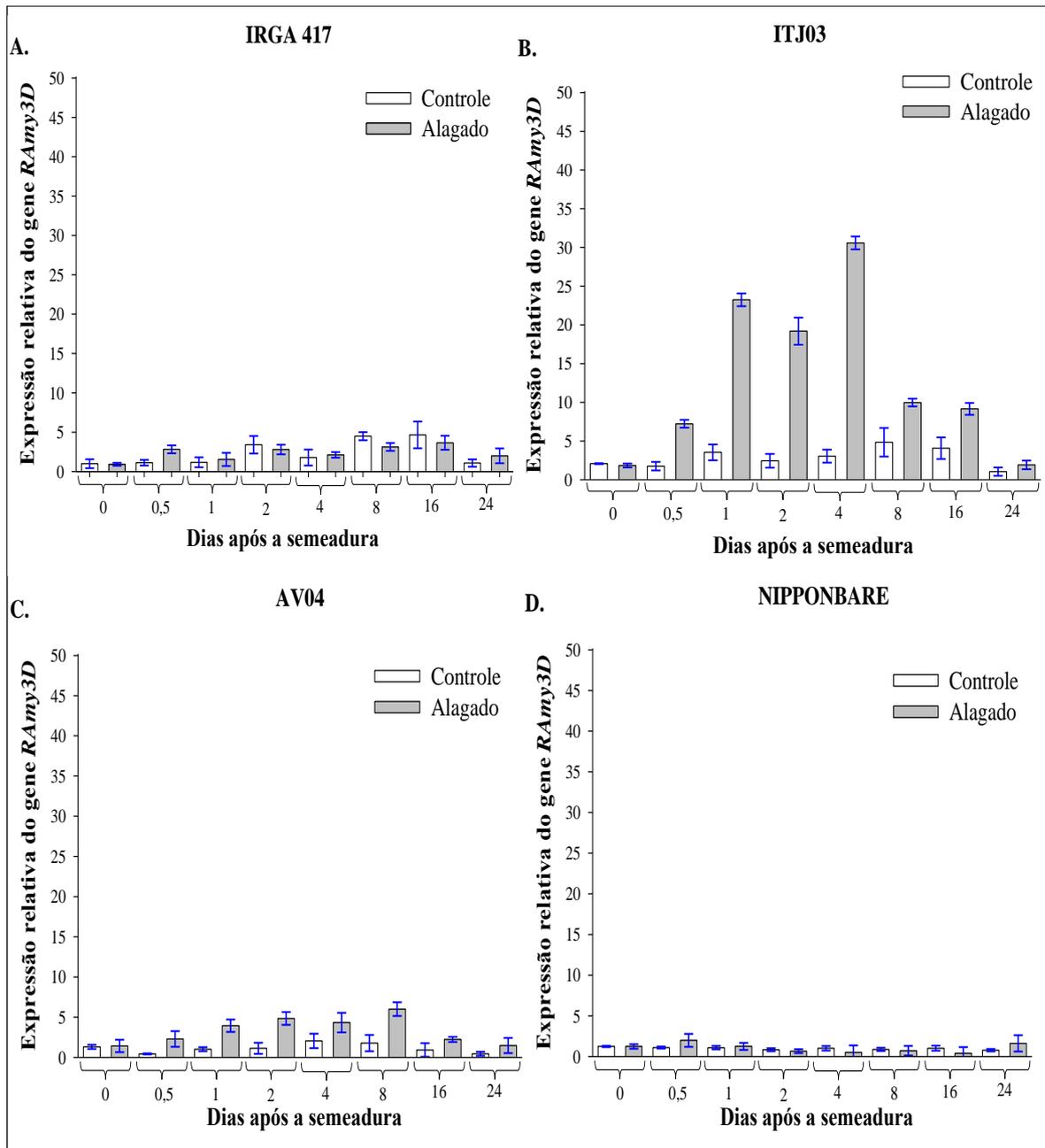


FIGURA 2. Expressão relativa do gene *Rice α -Amylase 3D* - *RAmy3D*, em genótipos de arroz (*Oryza sativa* L.), sensíveis – cultivar IRGA 417 e Nipponbare (A e D); tolerante – arroz daninho ITJ03 (B); e mediamente tolerante – arroz daninho AV04 (C) nas situações de solo alagado (lâmina de 10 cm) e úmido (controle) nos períodos de 0; 0,5; 1; 2; 4; 8; 16 e 24 dias após a semeadura. Barras verticais indicam o intervalo de confiança ($\alpha=0,05$). UFRGS, Porto Alegre - RS, Brasil, 2018.

A indução de *RAmy3D* diferente de outras α -amilases não ocorre por giberelinas, cuja síntese é dificultada sob submersão, mas pela disponibilidade de açúcar (Umemura *et al.* 1998). O rápido consumo de carboidratos solúveis durante as primeiras fases de germinação anaeróbica em sementes de arroz desencadeia a escassez de açúcar que induz a expressão de

RAmy3D e o catabolismo de carboidratos (Perdesen *et al.*, 2017). A quebra do amido libera carboidratos para a glicólise, que é a fonte de energia (ATP) para o metabolismo germinativo da semente (Lasanthi-Kudahettige *et al.*, 2007; Perdesen *et al.*, 2017). Deste modo, os genótipos de arroz daninho que possuem maior expressão de *RAmy3D* elevam a disponibilidade de carboidratos para a glicólise e conseguem obter a energia necessária para germinar, emergir e se estabelecer sob condição de submersão.

A cultivar de arroz IRGA 417 demonstrou desempenho significativo na presença de transcritos de *SUS3* na condição de 10 cm de lâmina de água aos 0,5; 1 e 2 DAS, com expressão relativa 7; 5 e 6 vezes superior a testemunha (Figura 3A). O genótipo ITJ03 tolerante à submersão, só apresentou significativo incremento na expressão relativa de *SUS3* na condição de solo alagado no período de 1 DAS, com desempenho 12 vezes maior que a testemunha (Figura 3B). Enquanto que AV04 e Nipponbare não apresentaram em nenhum período avaliado desempenho superior ao IRGA 417 na condição de submersão (Figura 3C e D). Na avaliação dos diferentes períodos sob alagamento e comparado a condição solo saturado, o genótipo de arroz daninho AV04 demonstrou maior nível de transcrito de *SUS3* apenas aos 2 e 8 DAS.

Investigações anteriores indicam que a expressão de *SUS3* na germinação de arroz cultivado sob alagamento foi elevada em até quatro vezes na comparação com a condição de disponibilidade de oxigênio (Magneschi and Perata, 2007). A maior presença de transcritos de *SUS3* poderia aumentar a disponibilidade de substrato para a glicólise e auxiliar na obtenção de energia para o metabolismo germinativo do arroz (Miro & Ismail, 2013). Entretanto a correlação entre *SUS3* e tolerância a submersão não foi comprovada, pois não houve diferença aparente na atividade da enzima sacarose sintase em sementes de genótipos de arroz tolerantes e sensíveis à submersão, quando avaliado em submersão (Ismail *et al.*, 2009). Este contexto corrobora o observado no presente trabalho, onde o genótipo IRGA 417 caracterizado como sensível ao alagamento apresentou maior expressão relativa do gene

SUS3, inferindo que os ganhos na quantidade de transcritos deste gene podem não representar ganhos adaptativos ao alagamento durante a fase de estabelecimento de arroz.

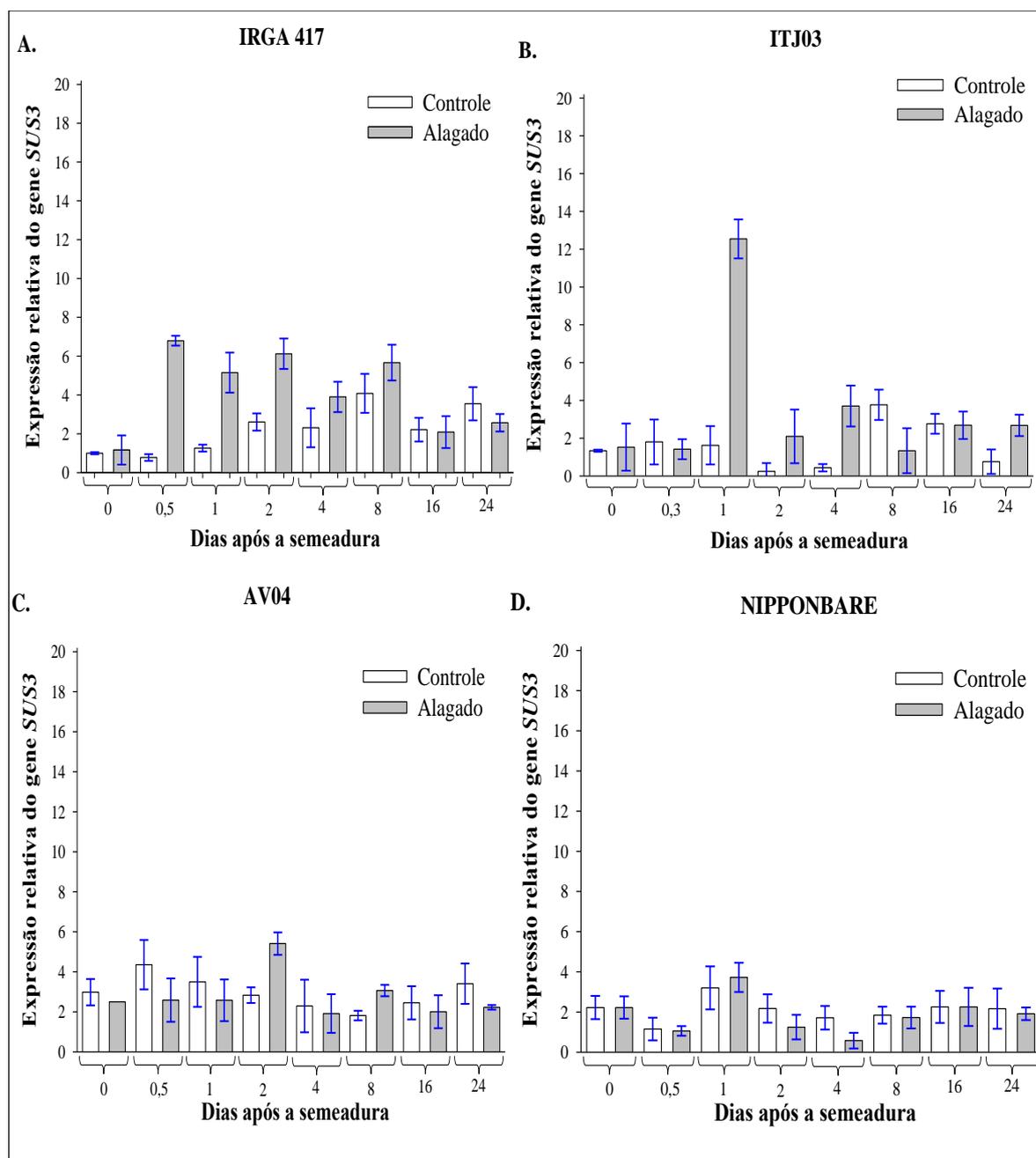


FIGURA 3. Expressão relativa do gene *Sucrose Synthase 3* – *SUS3* em genótipos de arroz (*Oryza sativa* L.), sensíveis – cultivar IRGA 417 e Nipponbare (A e D); tolerante – arroz daninho ITJ03 (B); e mediamente tolerante – arroz daninho AV04 (C) nas situações de solo alagado (lâmina de 10 cm) e úmido (controle) nos períodos de 0; 0,5; 1; 2; 4; 8; 16 e 24 dias após a semeadura. Barras verticais indicam o intervalo de confiança ($\alpha=0,05$). UFRGS, Porto Alegre - RS, Brasil, 2018.

O alagamento induziu diferencialmente a expressão relativa do gene *OsTPP7* para os genótipos utilizados, sendo que apenas os genótipos ITJ03 e AV04 obtiveram incrementos na quantidade de transcritos em todos os períodos avaliados após a semeadura (Figura 4). O genótipo ITJ03 apresentou os melhores desempenhos na expressão relativa de *OsTPP7*, com valores variando de 20; 47 e 30 vezes superior a testemunha, para 0,5; 4 e 24 DAS, respectivamente (Figura 4B). O desempenho do genótipo AV04 foi menos expressivo e manteve-se praticamente estável para a condição de alagamento, atingindo aproximadamente 10 vezes mais a expressão da testemunha (Figura 4C). Na comparação entre os dois genótipos de arroz daninho, o desempenho do ITJ03 frente ao AV04, para a condição alagada, foi 3 e 5 vezes superior aos 1 e 8 DAS.

A diferença observada para a expressão do gene *OsTPP7* corrobora a capacidade de estabelecimento dos diferentes genótipos em condição de alagamento, onde desempenho superior é observado para o ITJ03, intermediário para AV04 e menor para as cultivares IRGA 417 e Nipponbare que são consideradas sensíveis ao alagamento (Capítulo I). A correlação observada entre genótipos tolerantes ao alagamento e o aumento da expressão de *OsTPP7* durante o estabelecimento se deve a enzima codificada por esse gene atuar como sensor energético, determinando anabolismo ou catabolismo dependendo da disponibilidade local de sacarose (Kretzschmar *et al.*, 2015). Embora a cascata de sinalização de *OsTPP7* ainda não seja totalmente conhecida, estudos revelaram que este gene ao codificar a enzima fosfatase de trealose-6-fosfato sob condição de submersão promove o aumento da mobilização de amido, oferta de carboidratos para a glicólise, estimula o alongamento do coleóptilo e culmina no aumento da tolerância ao alagamento durante a germinação anaeróbica do arroz (Kretzschmar *et al.*, 2015, Zhang *et al.*, 2017). Deste modo, para o arroz daninho a atuação desse gene pode estar relacionado a ganho na capacidade de invasibilidade, adaptação aos sistema de cultivo e capacidade de infestação de áreas de cultivo que utilizam a lâmina de água como ferramenta de controle dessa planta daninha.

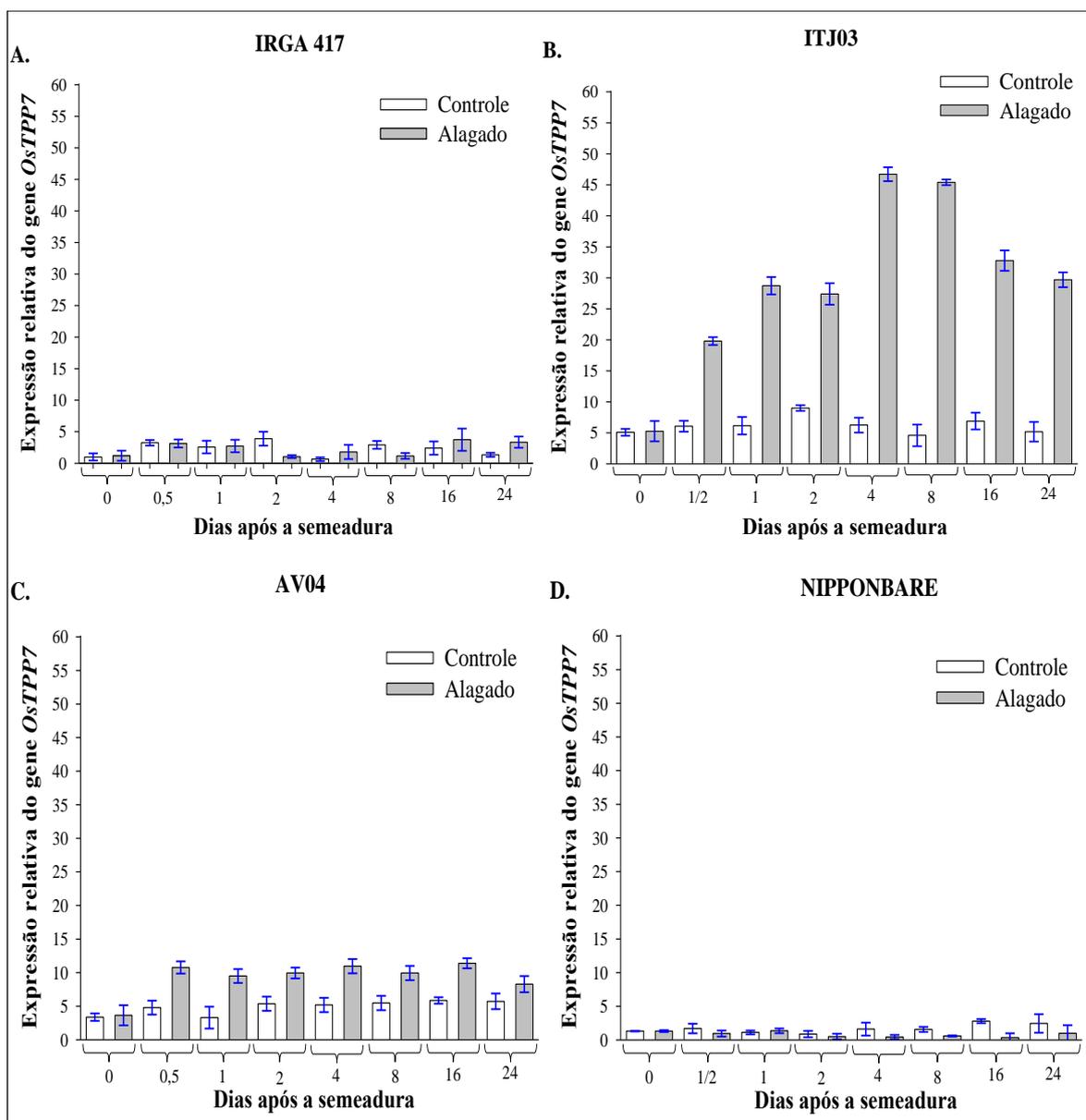


FIGURA 4. Expressão relativa do gene *Trehalose-6-Phosphate Phosphatase 7- OsTPP7* em genótipos de arroz (*Oryza sativa* L.), sensíveis – cultivar IRGA 417 e Nipponbare (A e D); tolerante – arroz daninho ITJ03 (B); e mediamente tolerante – arroz daninho AV04 (C) nas situações de solo alagado (lâmina de 10 cm) e úmido (controle) nos períodos de 0; 0,5; 1; 2; 4; 8; 16 e 24 dias após a semeadura. Barras verticais indicam o intervalo de confiança ($\alpha=0,05$). UFRGS, Porto Alegre - RS, Brasil, 2018.

4.3.1.3 Análise de expressão de genes envolvidos na respiração anaeróbica

A expressão relativa dos genes envolvidos com a respiração anaeróbica, *PDC1*, *ADH1* e *ADH2* demonstraram desempenhos distintos quanto a presença de submersão,

períodos de avaliação e genótipos utilizados (Figura 5, 6 e 7). Os genes *PDC1*, *ADH1* e *ADH2* codificam as enzimas piruvato descarboxilase 1 e álcool desidrogenase 1 e 2 (*ADH1* e *ADH2*) que atuam na manutenção da glicólise a partir do consumo de poder redutor NADH^+ na rota de fermentação alcoólica, regenerando NAD^+ (Takahashi *et al.*, 2014). O NAD^+ retorna a glicólise como acceptor de poder redutor, impedindo que essa rota de obtenção de energia em anaerobiose seja inibida (Magneschi & Perata, 2007). A atuação da piruvato descarboxilase 1 ocorre na transformação de piruvato, resíduo da glicólise, em acetaldeído, que na sequência é utilizado pelas enzimas ADH na produção de etanol (Lasanthi-Kudahettige *et al.*, 2007; Fukao *et al.*, 2011). Nesse contexto, a manutenção da glicólise, obtenção de energia em condição de submersão, bem como a tolerância a esse estresse está atrelada a expressão de *PDC1*, *ADH1* e *ADH2*.

A expressão relativa de *PDC1* não apresentou incremento significativo para a condição de alagamento, nos diferentes períodos avaliados para as cultivares Nipponbare e IRGA 417 (Figura 5A e 5D). Em todos os períodos avaliados em condição de submersão o genótipo ITJ03 demonstrou aumento da expressão relativa do gene *PDC*, com os maiores valores observados aos 0,5 e 2 DAS, com 7 e 6 vezes mais transcritos que a testemunha (Figura 5C). Resultados mais elevados são descritos para arroz cultivado, onde a expressão de *PDC1* relativa foi de até 594 vezes superior quando a germinação ocorreu em condição de alagamento (Magneschi & Perata, 2007).

O maior incremento na expressão relativa de *PDC1* foi verificado para o arroz daninho AV04 sob condição de alagamento 1 DAS, atingindo 13 vezes mais transcritos que a testemunha, IRGA 417 na condição saturada e tempo zero (Figura 5C). Esse desempenho não este de acordo em totalidade com o observado para a capacidade intermediária e elevada de estabelecimento demonstrada pelos genótipos AV04 e ITJ03, respectivamente. Nesse sentido, era esperado maior expressão para o genótipo ITJ03, pois investigações anteriores sugerem a necessidade da presença desse gene na resposta ao alagamento durante o

estabelecimento (Lasanthi-Kudahettige *et al.*, 2007; Takahashi *et al.*, 2014). Contudo, em estudos durante a germinação de arroz cultivado em condição de anaerobiose foi encontrada a presença do gene *PDC2*, cuja enzima produzida apresenta função similar na respiração alcoólica (Magneschi & Perata, 2007). Portanto, o gene *PDC2* poderia estar presente no genótipo ITJ03, auxiliando na manutenção da respiração anaeróbica.

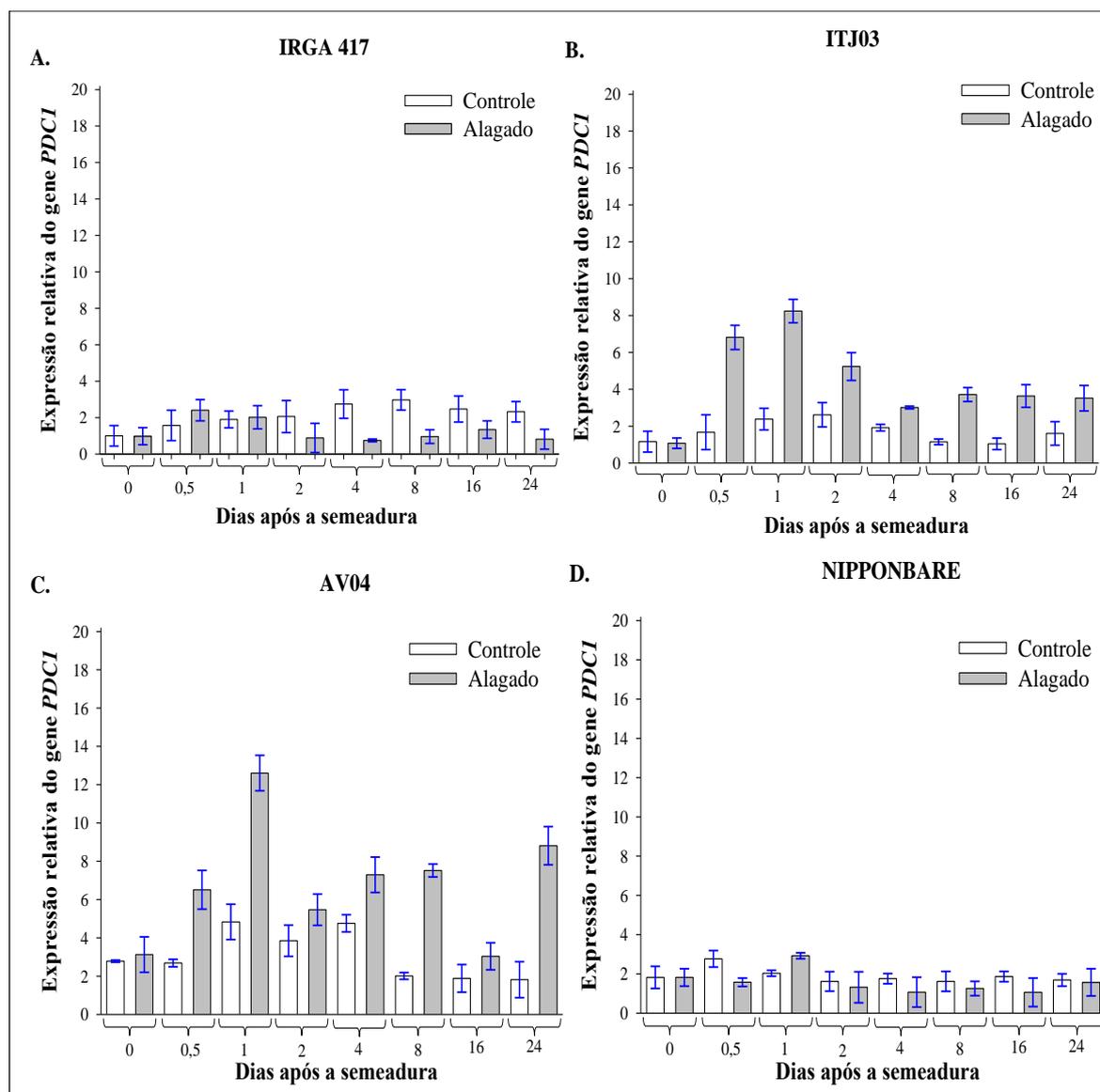


FIGURA 5. Expressão relativa do gene *Pyruvate Decarboxylase 1 -PDC1* em genótipos de arroz (*Oryza sativa* L.), sensíveis – cultivar IRGA 417 e Nipponbare (A e D); tolerante – arroz daninho ITJ03 (B); e mediamente tolerante – arroz daninho AV04 (C) nas situações de solo alagado (lâmina de 10 cm) e úmido (controle) nos períodos de 0; 0,5; 1; 2; 4; 8; 16 e 24 dias após a semeadura. Barras verticais indicam o intervalo de confiança ($\alpha=0,05$). UFRGS, Porto Alegre - RS, Brasil, 2018.

A cultivar IRGA 417 não demonstrou ganhos significativos na expressão relativa do gene *ADH2* nos períodos de avaliação e para as condições de alagamento e solo saturado (Figura 6A). A submersão induziu o aumento da expressão relativa desse gene no genótipo de arroz daninho ITJ03 tolerante ao alagamento, para todos os períodos de avaliação, com exceção dos 24 DAS (Figura 6B). Os ganhos em expressão para o genótipo ITJ03 sob submersão superaram em 12 vezes a testemunha no período de 1 DAS, e se mantiveram próximos a 10 vezes aos 0,5; 2 e 4 DAS. Desempenho similar foi observado em estudos comparativos em arroz cultivado, onde obteve-se aumento de quatro vezes na expressão de *ADH1* na cultivar tolerante na avaliação às seis horas após a semeadura sob submersão (Lasanthi-Kudahettige *et al.*, 2007).

O gene *ADH1* apresentou elevação de 6; 4; e 4 vezes na quantidade de transcritos quando aferida aos 1; 2 e 8 DAS no genótipo AV04 em condição de submersão quando comparado a testemunha (Figura 6C). O comportamento distinto dos genótipos de arroz quanto a expressão de *ADH1* reflete a capacidade diferencial de germinação e o crescimento inicial sob lâmina de água apresentada pelos mesmos, com baixa ou ausência de tolerância demonstrada pelas cultivares IRGA 417 e Nipponbare e, mediana e elevada tolerância dos genótipos AV04 e ITJ03, respectivamente (Capítulo I).

A expressão relativa do gene *ADH2* avaliado em oito períodos após a semeadura (DAS) demonstrou interação significativa entre as condições de submersão e genótipos de arroz (Figura 7). O genótipo de arroz cultivado IRGA 417 não apresentou variação na expressão relativa do gene *ADH2* em todos os períodos avaliados na condição de solo saturado, quando comparado a testemunha no período zero dias e condição de solo saturada (Figura 7A). Contudo, este mesmo genótipo apresentou elevação da expressão relativa na condição de submersão nos períodos de 0,5 e 1 dia, sendo 12 e 7 vezes superior a testemunha. A baixa indução de genes na resposta ao alagamento está de acordo com a baixa tolerância à submersão durante o estabelecimento da cultivar IRGA 417 que, apresentou apenas 16,7%

e 0,0% de emergência quando submetida a 5 e 10 cm de lâmina de água, respectivamente (Capítulo I).

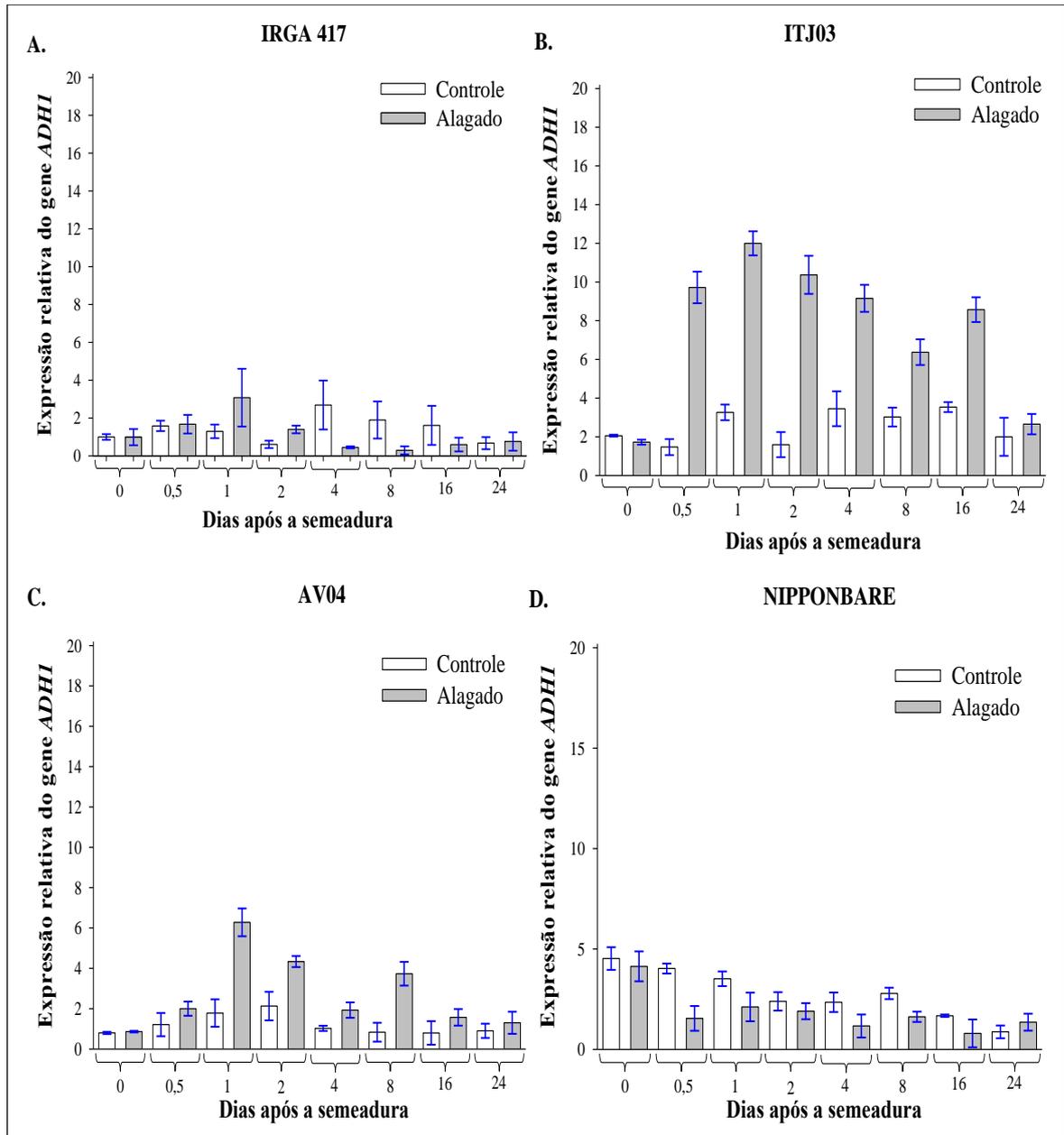


FIGURA 6. Expressão relativa do gene *Alcohol Dehydrogenase 1 - ADHI* em genótipos de arroz (*Oryza sativa* L.), sensíveis – cultivar IRGA 417 e Nipponbare (A e D); tolerante – arroz daninho ITJ03 (B); e mediamente tolerante – arroz daninho AV04 (C) nas situações de solo alagado (lâmina de 10 cm) e úmido (controle) nos períodos de 0; 0,5; 1; 2; 4; 8; 16 e 24 dias após a semeadura. Barras verticais indicam o intervalo de confiança ($\alpha=0,05$). UFRGS, Porto Alegre - RS, Brasil, 2018.

O arroz daninho ITJ03 demonstrou pequena elevação na expressão relativa do gene *ADH2* na condição de solo saturado, em todos os períodos avaliados, em comparação com a testemunha (Figura 7B). No entanto, sob condição de alagamento, o gene *ADH2* teve sua expressão estimulada pela baixa disponibilidade de oxigênio, com elevação da expressão já na avaliação de 0,5 DAS, com valor 20 vezes superior a testemunha. Nos períodos de 1; 2 e 4 dias após a semeadura sob condição de submersão foram observados para o ITJ03 os maiores valores de expressão relativa do gene *ADH2*, sendo 63; 57 e 29 vezes superior a testemunha, respectivamente. Em condição de alagamento a expressão relativa desse gene para o genótipo ITJ03 se manteve elevada, acima de 15 vezes na comparação à testemunha, até os últimos períodos de avaliação, 8, 16 e 24 DAS.

A avaliação de expressão relativa do gene *ADH2* realizada para o genótipo de arroz daninho AV04 revelou elevada expressão já no tempo zero dias, bem como em todos os períodos avaliados na condição sem alagamento em comparação aos genótipos IRGA 417 e ITJ03 (Figura 7C). Na condição de alagamento a expressão de *ADH2* foi estimulada no genótipo AV04, mas foi significativamente superior apenas nos períodos de 1; 16 e 24 DAS, na comparação com o mesmo genótipo semeado em solo saturado. Alternativamente, para os períodos de 0,5; 2; 4 e 8 DAS a maior expressão de *ADH2* no genótipo AV04 foi equivalente para ambas as condições de solo saturado e alagado. Deste modo, o efeito do alagamento foi variável entres os períodos avaliados e o genótipo AV04 apresenta maior expressão do gene *ADH2* independente do alagamento quando comparado aos demais genótipos. A tolerância intermediária atrelada a esse genótipo pode ser resultado de outro mecanismo atuando de forma isolada ou complementar à maior expressão relativa de *ADH2*. Ainda para o gene *ADH2*, o genótipo de arroz cultivado Nipponbare demonstrou não ter a expressão relativa desse gene induzida pela condição de submersão em nenhum dos períodos avaliados (Figura 7D).

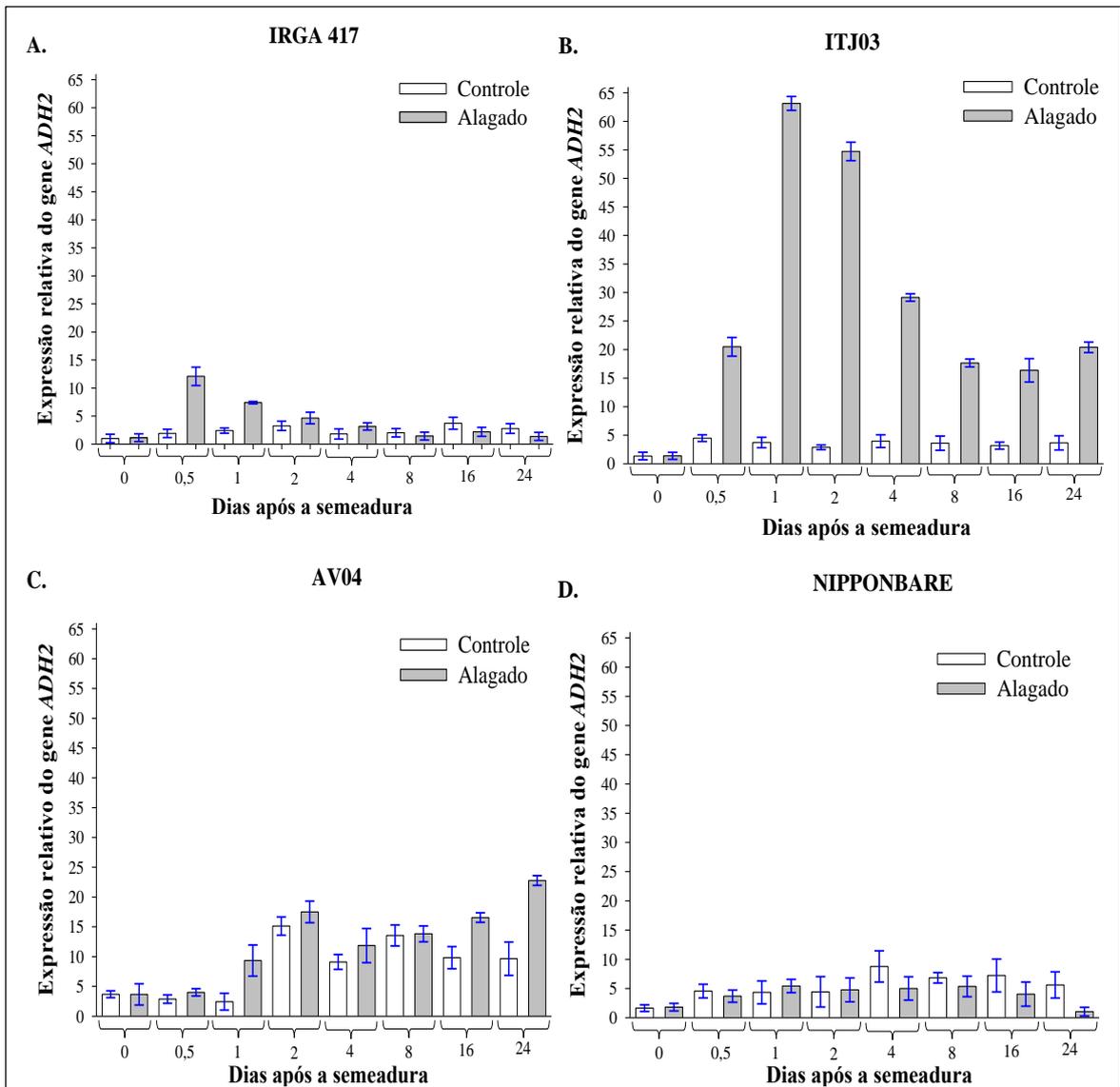


FIGURA 7. Expressão relativa do gene *alcohol dehydrogenase 2* – *ADH2* em genótipos de arroz (*Oryza sativa* L.), sensíveis – cultivar IRGA 417 e Nipponbare (A e D); tolerante – arroz daninho ITJ03 (B); e mediamente tolerante – arroz daninho AV04 (C) nas situações de solo alagado (lâmina de 10 cm) e úmido (controle) nos períodos de 0; 0,5; 1; 2; 4; 8; 16 e 24 dias após a semeadura. Barras verticais indicam o intervalo de confiança ($\alpha=0,05$). UFRGS, Porto Alegre - RS, Brasil, 2018.

4.3.1.4 Análise de expressão de gene envolvido com a estratégia de quiescência

O gene *Submergence 1 - Sub1A* não apresentou diferenças na expressão relativa para os genótipos de arroz utilizados em diferentes períodos de avaliação e frente as condições de presença ou ausência de lâmina de água durante a germinação e o crescimento inicial

(Figura 8). O gene *Sub1A*, fator de transcrição responsivo ao etileno, é responsável pela estratégia de quiescência durante a fase vegetativa do arroz (Xu *et al.*, 2006). As respostas promovidas por *SUB1A* são observadas para alagamentos rápidos e profundos, ocasionando a redução do alongamento dos entrenós da planta, desaceleração dos processos metabólicos e do crescimento (Bailey-Serres *et al.*, 2010; Schmitz *et al.*, 2013).

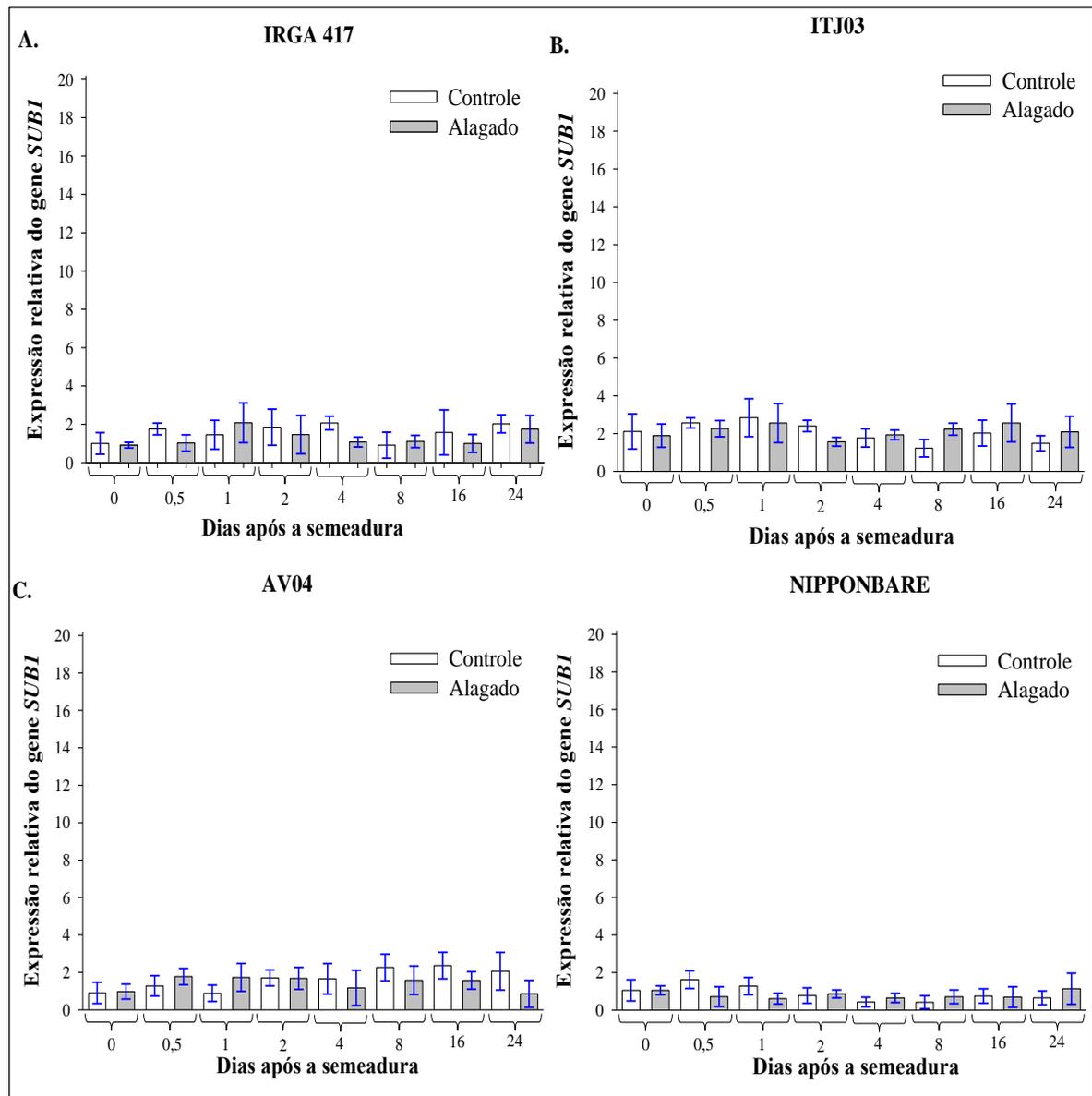


FIGURA 8. Expressão relativa do gene *Submergence 1 - Sub1A* em genótipos de arroz (*Oryza sativa* L.), sensíveis – cultivar IRGA 417 e Nipponbare (A e D); tolerante – arroz daninho ITJ03 (B); e mediamente tolerante – arroz daninho AV04 (C) nas situações de solo alagado (lâmina de 10 cm) e úmido (controle) nos períodos de 0; 0,5; 1; 2; 4; 8; 16 e 24 dias após a semeadura. Barras verticais indicam o intervalo de confiança ($\alpha=0,05$). UFRGS, Porto Alegre - RS, Brasil, 2018.

A ausência de alterações na expressão relativa do gene *SUBIA* sugerem que o mecanismo de quiescência não está presente nos genótipos de arroz daninho como resposta ao alagamento até os 24 DAS. Em estudos com cultivares contrastantes quanto a presença do gene *SUBIA* não foram verificadas alterações na capacidade de germinação sob alagamento (Sarkar, 2012). Ainda nesse contexto, plântulas com 15 dias de idade da cultivar IR64-SUB1, detentora da estratégia de quiescência, apresentaram apenas 11% de sobrevivência quando submetidas à submersão (Gautam, et al., 2017). A atuação do mecanismo de tolerância ao alagamento regido pelo gene *SUB1* ocorre após o estabelecimento do arroz e não apresenta efeito sobre a germinação e emergência sob submersão.

4.3.1.5 Análise de expressão de gene envolvido com a estratégia de escape

A expressão relativa do gene *SNORKEL 1 (SNRK1)* apresentou os maiores valores para os genótipos de arroz daninho, foi praticamente inexistente para a cultivar Nipponbare e apresentou pouco incremento para a cultivar IRGA 417 (Figura 9). O gene *SNRK1* foi significativamente mais expresso para o genótipo AV04 na condição de alagamento apenas aos 2; 4 e 8 DAS com valores respectivos de 3; 8 e 14 vezes superior a testemunha (Figura 9C). Enquanto que para o genótipo ITJ03 a expressão relativa do gene *SNRK1* foi induzida pelo alagamento em todos os períodos após a semeadura, com o maior valor de expressão ocorrendo 1 DAS, sendo 63 vezes maior que o valor observado para a testemunha (Figura 9B). Ainda para o genótipo ITJ03 e condição de alagamento, a expressão relativa foi de 16 vezes aos 0,5DAS e se manteve próximo a 30 vezes nos períodos de 2; 4 e 8 DAS.

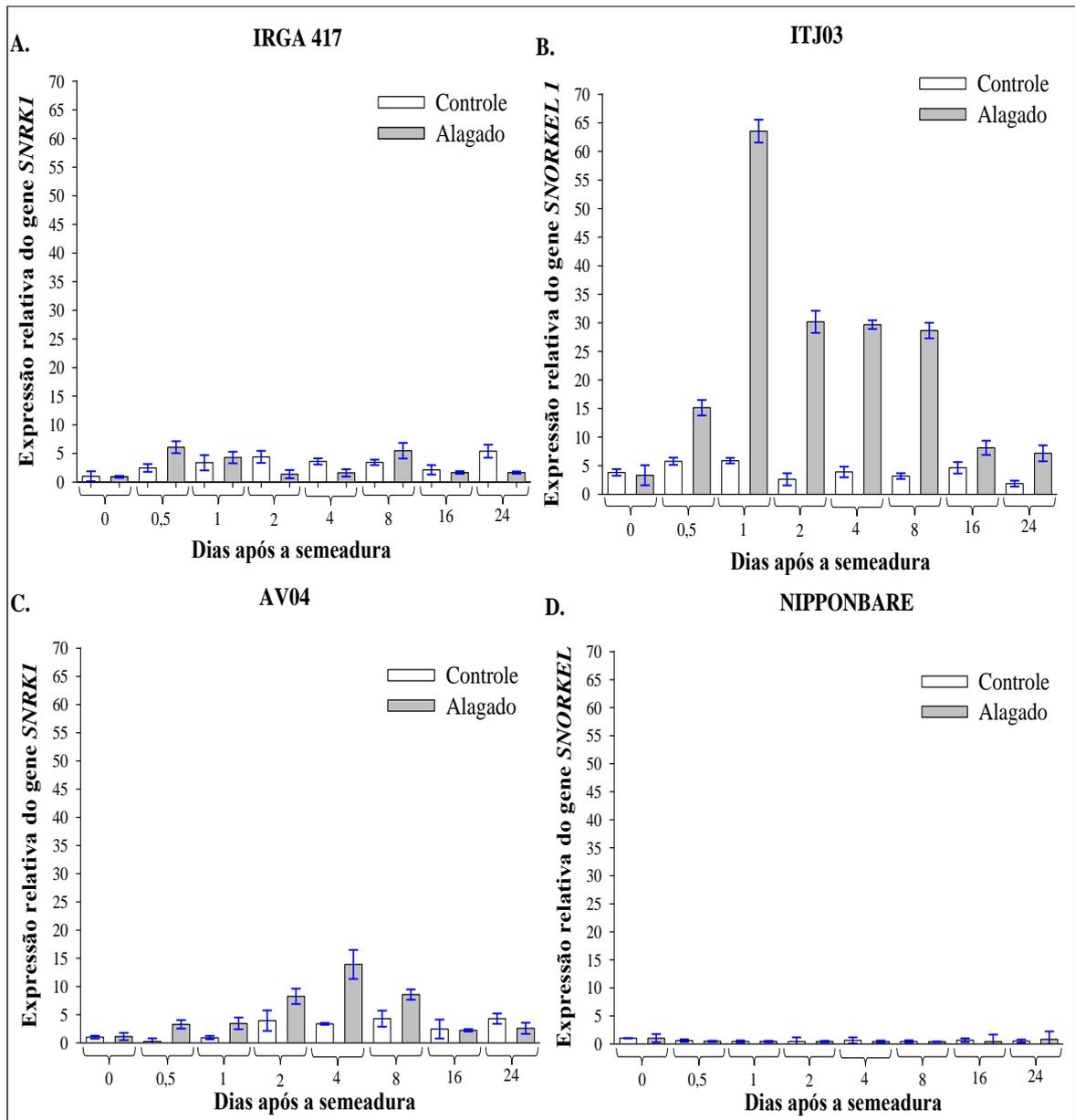


FIGURA 9. Expressão relativa do gene *SNORKEL 1* (*SNRK1*) genótipos de arroz (*Oryza sativa* L.), sensíveis – cultivar IRGA 417 e Nipponbare (A e D); tolerante – arroz daninho ITJ03 (B); e mediamente tolerante – arroz daninho AV04 (C) nas situações de solo alagado (lâmina de 10 cm) e úmido (controle) nos períodos de 0; 0,5; 1; 2; 4; 8; 16 e 24 dias após a semeadura. Barras verticais indicam o intervalo de confiança ($\alpha=0,05$). UFRGS, Porto Alegre - RS, Brasil, 2018.

A atuação do gene *SNRK1* durante o estabelecimento do arroz sob submersão está relacionada com a indução do rápido alongamento do coleóptilo e a promoção do escape da lâmina de água (Hattori *et al*, 2011; Miro & Ismail, 2013). Deste modo, genótipos com elevada capacidade de alongamento do coleóptilo conseguem emergir em menor período de

tempo, atingindo a superfície da água e podendo iniciar a obtenção de energia por meio das vias aeróbicas (Ismail *et al.*, 2012). O genótipo de arroz daninho ITJ03 ao possuir elevada expressão de *SNRK1*, apresenta rápido crescimento do coleóptilo e crescimento inicial, permitindo rápido estabelecimento mesmo na presença de lâmina de água. Deste modo, a presença do mecanismo de escape mediado por *SNRK1* pode se caracterizar como a última etapa da sequência de ajustes do metabolismo observadas para o genótipo tolerante ITJ03, que envolve a mobilização de reservas através dos genes *RAmy3D*, *OsTPP7* e *SUS3*, respiração anaeróbica obtida através de *PDC1*, *ADH1* e *ADH2* e culmina com o rápido alongamento de coleóptilo e emergência obtido devido a maior expressão do gene *SNORKEL1*. Sendo assim, a elevada capacidade de emergir sob condição de submersão apresentado pelo genótipo de arroz daninho ITJ03, pode ser resultante da atuação conjunta destes mecanismos de tolerância ao alagamento.

4.3.2 II – Efeito da temperatura sobre a expressão de genes relacionados a tolerância à submersão em arroz daninho

4.3.2.1 Análise de estabilidade de genes referência em diferentes temperaturas

O gene de referência *18S* em todos os tratamentos avaliados (genótipos de arroz x lâmina de água x temperaturas) apresentou maior quantidade de transcritos a partir de menor número de ciclos na reação de *PCR* em tempo real quando comparado ao demais genes reguladores. Os Cts médios observados foram 15; 20; 27 e 27 para os genes de referência *18S*, *Ubiquitina-10*, *Actina* e *ELF4-a*, respectivamente (Figura 10A). Os genes *18S* e *UBI-10* demonstraram menor variação na amplitude Cts, com menor intervalo de confiança e maior estabilidade frente aos tratamentos em que foram avaliados.

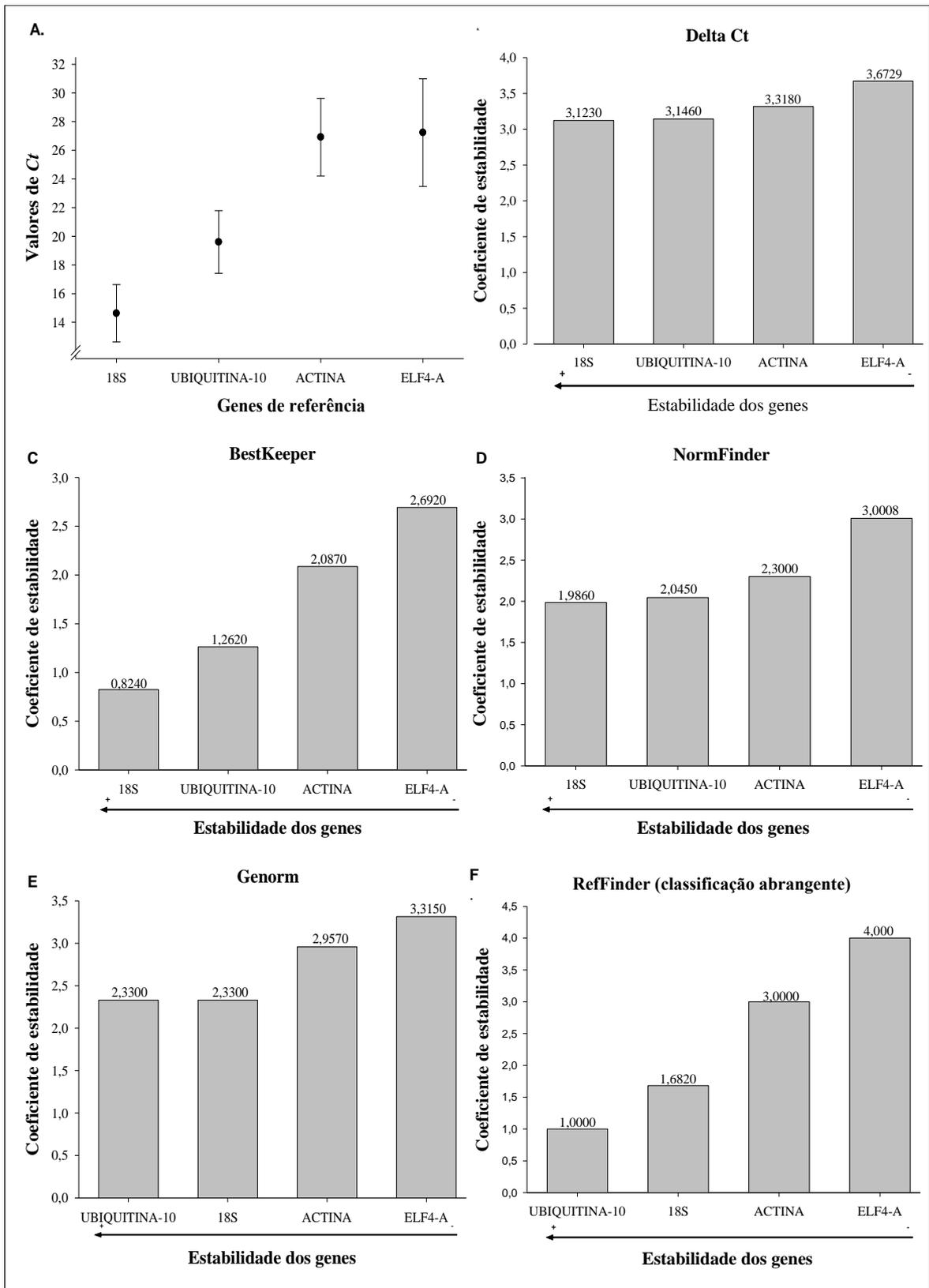


FIGURA 10. Valores de Ct (A) e Coeficiente de estabilidade obtidos a partir dos programas computacionais Delta Ct (B), BestKeeper (C), NormFinder (D) e geNorm (E) e RefFinder (F) para quatro genes referência para arroz e arroz daninho (*Oryza sativa* L.) submetidos a submersão e diferentes temperaturas durante a germinação e o crescimento inicial. Quanto menor o valor do coeficiente, maior a estabilidade do gene. UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil. 2018.

A estabilidade dos genes de referência, aferida pelo programa computacional RefFinder que utiliza um compilado de quatro algoritmos, indicou maior estabilidade para o gene *UBI-10* para os tratamentos utilizados neste estudo (Figura 10 B, C, D, E e F). A classificação abrangente de estabilidade indicou menor estabilidade para os genes *ELF4-A* e *ACTINA*, com índices de 4,000 e 3,000, enquanto os genes *UBI-10* e *18S* apresentaram valores de 1,000 e 1,6820 respectivamente (Figura 4F). Deste modo, os genes que apresentam os menores valores para os coeficientes de estabilidade são menos influenciados pelos tratamentos utilizados no estudo, tornando-se mais estáveis e indicados como normalizadores para a utilização em análise de expressão relativa (Xie *et al.*, 2012). Assim, a média de *UBI-10* e *18S* foi utilizada na normalização dos dados de expressão relativa de forma a elevar a confiabilidade e a visualização das diferenças de expressão dos genes alvo (Nakayama *et al.*, 2014).

4.3.2.2 Análise de expressão de gene envolvido com a mobilização de reservas

A variação de temperatura, o sistema radicular e parte aérea e os genótipos avaliados demonstraram interação significativa sobre a expressão relativa do gene *RAmy3D* aos 14 DAS (Figura 11). Na temperatura de 20 °C nenhum genótipo apresentou emergência em condição de 10 cm de lâmina de água, não havendo parte aérea a ser coletado, inviabilizando a análise de expressão relativa. Nessa condição só foi avaliada a expressão relativa nos tecidos radiculares que também incluiu a região embrionária da semente. As temperaturas de 25 e 30 °C proporcionaram a emergência dos diferentes genótipos de arroz, possibilitando as análises de expressão na parte aérea (Figura 11, 12 e 13). Para essas temperaturas a cultivar IRGA 417 demonstrou aumento de até cinco vezes na expressão de *RAmy3D* quando avaliado na parte aérea, mas não foram observadas diferenças quanto ao efeito do alagamento em cada temperatura (Figura 11A). Este mesmo genótipo obteve maior

expressão de *RAmy3D* quando analisado o sistema radicular na temperatura de 25 °C, cerca de 10 vezes superior a testemunha, contudo sem diferenças na expressão relativa em função do alagamento.

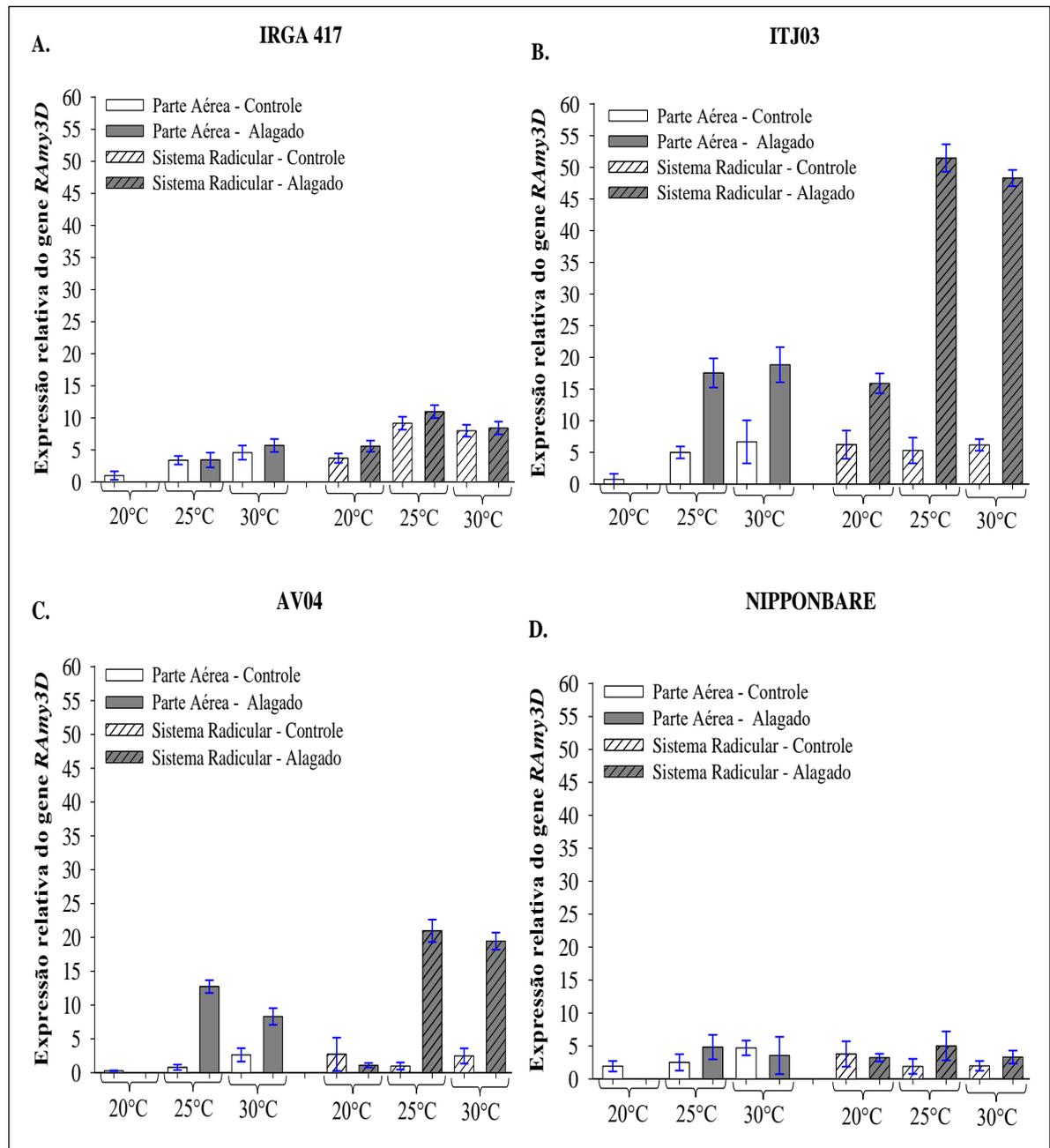


FIGURA 11. Expressão relativa do gene *Rice α -Amylase 3D - RAmy3D*, em genótipos de arroz (*Oryza sativa* L.), sensíveis – cultivar IRGA 417 e Nipponbare (A e D); tolerante – arroz daninho ITJ03 (B); e mediantemente tolerante – arroz daninho AV04 (C) nas situações de solo alagado (lâmina de 10 cm) e úmido (controle), sob diferentes temperaturas (20, 25 e 30 °C) aos 14 dias após a semeadura. Barras verticais indicam o intervalo de confiança ($\alpha=0,05$). UFRGS, Porto Alegre - RS, Brasil, 2018.

O genótipo de arroz daninho ITJ03 apresentou os maiores valores de expressão relativa quando comparado aos demais genótipos (Figura 11B). A mensuração de *RAmy3D* na parte aérea demonstrou incrementos de 17 e 19 vezes para as temperaturas de 25 e 30 °C em condição de alagamento. Para a condição de solo saturado o aumento da expressão relativa desse gene para as mesmas temperaturas foi de 5 e 7 vezes. Não foi observada diferença na expressão de *RAmy3D* no sistema radicular do genótipo ITJ03 frente as diferentes temperaturas. Entretanto, sob condição de alagamento o incremento da expressão relativa foi de 16; 51 e 48 vezes para as temperaturas 20, 25 e 30 °C, demonstrando o efeito indutivo do alagamento sobre o gene *RAmy3D*. A maior presença de transcritos de *RAmy3D* no sistema radicular sob alagamento ocorre em função do mesmo apresentar função mobilizadora de reservas, um dos primeiros mecanismos de resposta ao alagamento (Ismail *et al.*, 2009).

A presença de transcritos do gene *RAmy3D* também foi estimulada no genótipo AV04, onde a expressão relativa na parte aérea foi aumentada em 13 e 8 nas temperaturas de 25 e 30 °C, sob alagamento (Figura 11C). Nessas mesmas condições, no sistema radicular do genótipo AV04 foi identificado aumento da expressão relativa de *RAmy3D* em 21 e 19 vezes, quando comparado a testemunha. De forma geral, a cultivar Nipponbare não apresentou variações da expressão relativa do gene *RAmy3D* em função das diferentes temperaturas ou condição de alagamento ou solo saturado (Figura 11D). A expressão do gene envolvido com a mobilização de reservas *RAmy3D* apresentou nos genótipos de arroz daninho, menor quantidade de transcritos quando avaliado no sistema radicular a 20 °C.

A menor expressão de *RAmy3D* contribui para a redução da mobilização de reservas, diminuindo a oferta de substrato para a glicólise e obtenção de energia (Ismail *et al.*, 2009; Perdesen *et al.*, 2017). A menor disponibilidade de energia durante a germinação e estabelecimento reduz a capacidade de desenvolvimento do embrião, impedindo sua

emergência. Deste modo, a utilização do alagamento em condições de menor temperatura pode ser uma estratégia de manejo a ser adotada no controle de arroz daninho tolerante ao alagamento durante o estabelecimento.

4.3.2.3 *Análise de expressão de gene envolvido com a respiração anaeróbica*

A análise de expressão relativa do gene *Alcohol Dehydrogenase 2 – ADH2* em diferentes genótipos de arroz submetidos à submersão durante a germinação e o crescimento inicial revelaram diferenças significativas em função da temperatura e dos tecidos avaliados (Figura 12). A quantidade de transcritos mensurada na parte aérea do genótipo IRGA 417 não apresentou diferença significativa entre a presença ou ausência de lâmina de água na temperatura de 25 °C, entretanto a 30 °C a expressão sob alagamento e em solo saturado foi de 10 e 2 vezes superior a testemunha, respectivamente (Figura 12 A). Ainda em IRGA 417, a expressão de *ADH2* no sistema radicular foi de 12 e 15 vezes superior quando avaliada em condição submersa nas temperaturas de 20 e 30 °C, mas não diferenciou da testemunha na condição de solo saturado.

O aumento da temperatura induziu o aumento da expressão relativa do gene *ADH2*, quando o genótipo de arroz daninho ITJ03 foi submetido a submersão (Figura 12B). A parte aérea desse genótipo apresentou ganhos de 29 e 35 vezes para as temperaturas de 20 e 30 °C, na comparação com a testemunha. Contudo, quando mensurado no sistema radicular submerso a expressão relativa foi de 10; 31 e 42 vezes superior a testemunha nas para as temperaturas de 20, 25 e 30 °C. Para os mesmos períodos e temperaturas, mas na condição de solo saturado a expressão relativa do gene *ADH2* atingiu apenas 33; 11 e 2% do observado na condição de submersão.

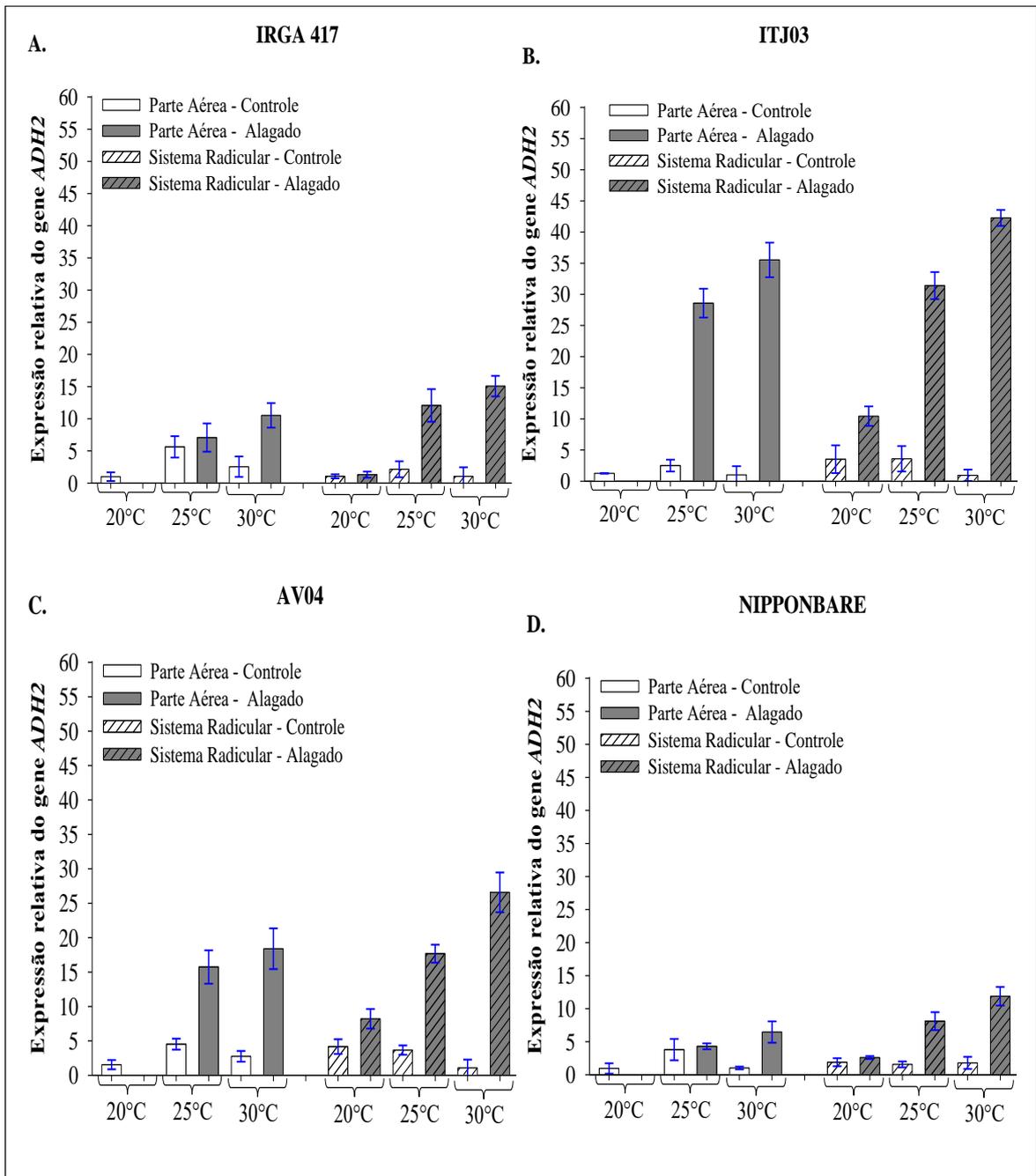


FIGURA 12. Expressão relativa do gene *Alcohol Dehydrogenase 2* – *ADH2*, em genótipos de arroz (*Oryza sativa* L.), sensíveis – cultivar IRGA 417 e Nipponbare (A e D); tolerante – arroz daninho ITJ03 (B); e mediamente tolerante – arroz daninho AV04 (C) nas situações de solo alagado (lâmina de 10 cm) e úmido (controle), sob diferentes temperaturas (20, 25 e 30 °C) aos 14 dias após a semeadura. Barras verticais indicam o intervalo de confiança ($\alpha=0,05$). UFRGS, Porto Alegre - RS, Brasil, 2018.

Em condição de solo saturado o efeito da temperatura sobre a expressão observada do gene *ADH2* na parte aérea e no sistema radicular do genótipo AV04 foi discreta, não

ultrapassando cinco vezes o valor observado para a testemunha (Figura 12C). Contudo, em condição de alagamento e na parte aérea o aumento não apresentou diferença significativa para as temperaturas de 25 e 30 °C, com médias superiores a 15 vezes o observado para a testemunha. A expressão de *ADH2* para o sistema radicular do genótipo AV04 sob submersão demonstrou ser estimulada pelo aumento da temperatura, apresentando incremento de 117 e 324% para as temperaturas de 25 e 30 °C quando comparadas a 20 °C. A expressão relativa do gene *ADH2* também foi estimulada para condição de alagamento aos 25 e 30 °C para a parte aérea e radicular do genótipo Nipponbare sob alagamento, sendo observada incremento de 12 vezes na expressão relativa para o tecido radicular na maior temperatura (Figura 12D).

A maior atividade de enzimas ADH, codificadas pelos genes *ADH1* e *ADH2*, são relatadas em cultivares de arroz tolerantes ao frio quando germinadas sob baixas temperaturas (Mertz *et al.*, 2009; Sartori, *et al.*, 2014). Deste modo, é inferida a participação do mesmo mecanismo de tolerância em resposta aos dois estresses. A atuação do frio e alagamento agravam os danos ao metabolismo, tornando insuficiente a atuação deste mecanismo na tolerância, que resulta em maiores dificuldades para o estabelecimento do arroz sob estas condições. Desta forma, o preparo antecipado da área e entrada precoce da água nas áreas de cultivo, enquanto as temperaturas estiverem amenas, pode auxiliar no manejo da tolerância ao alagamento no germinação e o crescimento inicial do arroz daninho. Contudo, a entrada da água tardiamente e formação de lâmina de até 10 cm, não evita a emergência de arroz daninho que apresente tolerância a submersão.

4.3.2.4. Análise de expressão de gene envolvido com a estratégia de escape

A expressão relativa do gene *SNRK1* não apresentou diferenças significativas quando avaliado em tecido da parte aérea e radicular na cultivar IRGA 417, sob condição de alagamento ou solo saturado e nas temperaturas de 25 e 30 °C (Figura 13A). Desempenho

similar foi observado para a cultivar Nipponbare avaliada nas mesmas condições (Figura 13D). O gene *SNRK1* está envolvido em respostas de fuga do alagamento em arroz cultivado (Hattori *et al.* 2011). Portanto, a ausência de estímulo na expressão desse gene suporta a incapacidade de tolerar o alagamento durante o estabelecimento das cultivares Nipponbare e IRGA417.

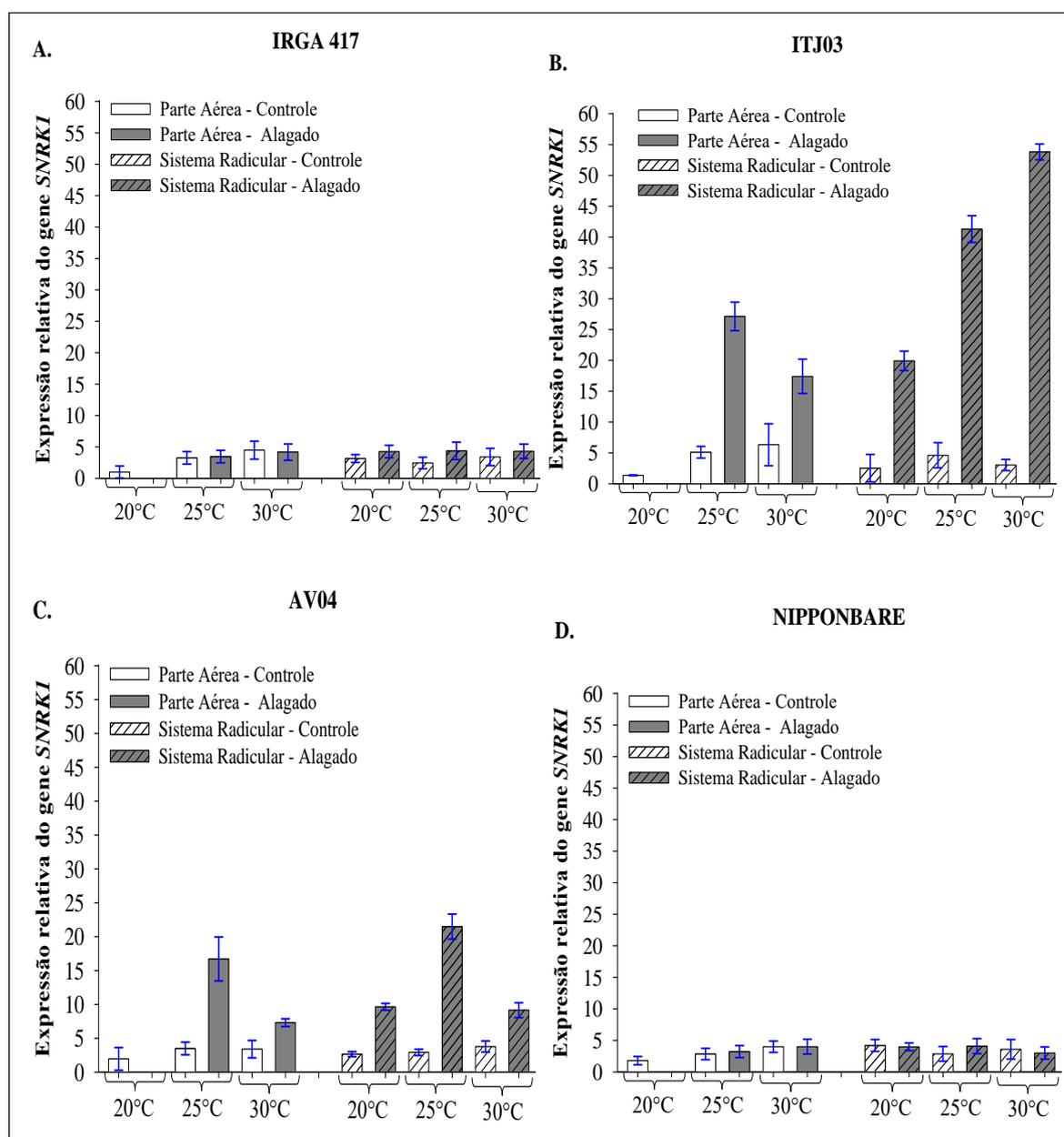


FIGURA 13. Expressão relativa do gene *SNORKEL 1* (*SNRK1*) em genótipos de arroz (*Oryza sativa* L.), sensíveis – cultivar IRGA 417 e Nipponbare (A e D); tolerante – arroz daninho ITJ03 (B); e mediantemente tolerante – arroz daninho AV04 (C) nas situações de solo alagado (lâmina de 10 cm) e úmido (controle), sob diferentes temperaturas (20, 25 e 30 °C) aos 14 dias após a semeadura. Barras verticais indicam o intervalo de confiança ($\alpha=0,05$). UFRGS, Porto Alegre - RS, Brasil, 2018.

A tolerância ao alagamento durante o desenvolvimento inicial dos genótipos de arroz daninho ITJ03 e AV04 está atrelada a estratégia de escape promovida pelo gene *SNRK1*, pois este gene demonstrou estar presente e ser estimulado positivamente pelo alagamento e incremento da temperatura (Figura 13B e 13C). A expressão relativa foi de 27 e 17 vezes superior a testemunha quando mensurada na parte aérea de plantas para o genótipo ITJ03 submetido a submersão nas temperaturas 25 e 30 °C, respectivamente. Nessas mesmas condições, mas no sistema radicular, a expressão relativa foi 41 e 54 vezes superior a testemunha. O genótipo AV04 não demonstrou diferença significativa na expressão do gene *SNRK1* em nenhuma temperatura utilizada e tecido avaliado na condição de solo saturado (Figura 13C). Contudo, quando submetido ao alagamento e na temperatura de 25 °C, o incremento em expressão foi de 17 e 21 vezes para a parte aérea e radicular, respectivamente. A expressão relativa do gene *SNRK1* observada na condição de alagamento está de acordo com a classificação de mediantemente tolerante e tolerante ao alagamento durante o estabelecimento descritas para os genótipos de arroz daninho AV04 e ITJ03 (Capítulo I). De modo geral, na condição de alagamento e com 25 °C, foi observada a maior expressão relativa do gene *SNRK1*, demonstrando efeito sinérgico dessa temperatura sobre o aumento dos transcritos desse gene.

A elevada capacidade de germinar, emergir e se estabelecer do arroz daninho em condição de submersão exige adequações das cultivares de arroz a serem utilizadas, de forma a proporcionar maior capacidade competitiva frente a essa planta daninha. Portanto, cultivares com rápida capacidade de mobilização de reservas, manutenção da respiração anaeróbica e alongamento do coleóptilo durante a germinação e o crescimento inicial sob condições de elevadas lâminas de água, temperatura amenas e adaptadas a semeaduras precoces poderão ser alternativas para o manejo do arroz daninho. Assim, as cultivares adaptadas poderão ser semeadas diretamente em lâmina de água, reduzindo a incidência de

arroz daninho sem prejuízos a produção causado pelo alagamento nos estádios iniciais de desenvolvimento.

4.4 Conclusões

A expressão relativa diferencial dos genes *RAmy3D*, *OsTPP7*, *ADH1* e *ADH2* relacionados com a mobilização de reservas e manutenção da respiração anaeróbica, respectivamente, indica a participação desses mecanismos na tolerância a submersão durante a germinação e o crescimento inicial dos genótipos de arroz daninho ITJ03. A estratégia de escape do alagamento, mediada pela expressão diferencial do gene *SNRK1*, também pode estar associada com a tolerância ao alagamento do genótipo ITJ03 durante o a fase de crescimento inicial. Esses mecanismos de tolerância são descritos para cultivares de arroz asiáticas, mas não têm sido associados na respostas a este estresse em arroz daninho. A participação da estratégia de quiescência mediada pelo gene *SUB1*, já relatado em arroz cultivado, não foi observada nos genótipos de arroz daninhos utilizados. Além disso, o gene *PDC1* associado a manutenção da respiração anaeróbica sob condição de submersão em cultivares de arroz tolerante, apresentou baixa indução no genótipo de arroz daninho tolerante.

A baixa temperatura influenciou negativamente a expressão dos genes *RAmy3D*, *ADH2* e *SNRK1* na parte aérea e radicular dos genótipos de arroz daninho durante o estabelecimento, enquanto que nas temperaturas de 25 e 30 °C as suas expressões foram estimuladas, especialmente em condição de submersão. A condição de baixa temperatura acentuou o efeito da presença da lâmina de água sobre a capacidade de estabelecimento do arroz daninho, sendo que a utilização conjunta destes fatores pode ser estratégia viável para o controle de genótipos dessa planta daninha tolerantes ao alagamento.

4.5 Referências

- ANGAJI, S.A. *et al.* QTLs associated with tolerance of anaerobic conditions during germination in rice (*Oryza sativa* L.). **Euphytica**, Wageningen, v. 172, n. 2, p. 159-168, 2010.
- BAILEY-SERRES, J. *et al.* Submergence tolerant rice: SUB1's journey from landrace to modern cultivar. **Rice**, New York, v. 3, n. 2-3, p. 138–147, 2010.
- BENEMANN, D.P. *et al.* Identification and validation of reference genes for the normalization in real-time rt-qpcr on rice and red rice in competition, under different nitrogen doses. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 35, e01716131, 2017.
- DUSSAULT, A.A.; POULIOT, M. Rapid and simple comparison of messenger RNA levels using real-time PCR. **Biological Procedures Online**, London, v. 8, n. 1, p. 1-10, 2006.
- FUKAO, T.; YEUNG, E.; BAILEY-SERRES, J. The submergence tolerance regulator *SUB1A* mediates crosstalk between submergence and drought tolerance in rice. **Plant Cell**, Rockville, v. 23, n. 1, p. 412–427, 2011.
- GAUTAM, P. *et al.* Impact of Seedling Age and Nitrogen Application on Submergence Tolerance of Sub1 and Non-Sub1 Cultivars of Rice (*Oryza sativa* L.). **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, v. 36, n. 3, p. 629-642, 2017.
- HATTORI, Y. *et al.* The ethylene response factors *SNORKEL1* and *SNORKEL2* allow rice to adapt to deep water. **Nature**, London, v. 460, n. 7258, p. 1026-1031, 2009.
- HATTORI, Y.; NAGAI, K.; ASHIKARI, M. Rice growth adapting to deepwater. **Current opinion in plant biology**, London, v. 14, n. 1, p. 100–105, 2011.
- IRFAN, M. *et al.* Physiological and biochemical changes in plants under waterlogging. **Protoplasma**, New York, v. 241, n. 1-4, p. 3–17, 2010.
- ISMAIL, A.M. *et al.* Mechanisms associated with tolerance to flooding during germination and early seedling growth in rice (*Oryza sativa*). **Annals of Botany**, Oxford, v. 103, n. 2, p. 197–209, 2009.
- ISMAIL, A.M. *et al.* Adaptation to flooding during emergence and seedling growth in rice and weeds, and implications for crop establishment. **AoB Plants**, Oxford, v. 2012, pls019, 2012.
- JAIN, M. *et al.* Validation of housekeeping genes as internal control for studying gene expression in rice by quantitative real-time PCR. **Biochemical and biophysical research communications**. New York, v. 345, n. 2, p. 646-651, 2006.
- KRETZSCHMAR, T. *et al.* A trehalose-6-phosphate phosphatase enhances anaerobic germination tolerance in rice. **Nature Plants**, New York, v. 1, n. 9, p. 1-5, 2015.
- LASANTHI-KUDAHETTIGE, R. *et al.* Transcript profiling of the anoxic rice coleoptile. **Plant Physiology**, Rockville, v. 144, n. 1, p. 218–231, 2007.

LORETI, E. *et al.* Gene regulation and survival under hypoxia requires starch availability and metabolism. **Plant Physiology**, Rockville, v. 176, n. 2, p. 1286-1298, 2017.

LORETI, E.; VAN, V.H.; PERATA, P. Plant responses to flooding stress. **Current opinion in plant biology**, London, v. 33, n. 1, p. 64–71, 2016.

MAGNESCHI, L.; PERATA, P. Rice germination and seedling growth in the absence of oxygen. **Annals of Botany**, Oxford, v. 103, n. 2, p. 189–196, 2009.

MERTZ, L.M. *et al.* Alterações fisiológicas em sementes de arroz expostas ao frio na fase de germinação. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 31, n. 2, p. 254-262, 2009.

MIRO, B.; ISMAIL, A.M. Tolerance of anaerobic conditions caused by flooding during germination and early growth in rice (*Oryza sativa* L.). **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 4, n. 269, p. 1-18, 2013.

NAKAYAMA T.J. *et al.* Reference genes for quantitative real-time polymerase chain reaction studies in soybean plants under hypoxic conditions. **Genetics and molecular research**, Ribeirão Preto, v. 13, n. 1, p. 860–871, 2014.

PEDERSEN, A.D.O.; PERATA, B.P.; VOESENEK, A.C.J.L. Flooding and low oxygen responses in plants. **Functional Plant Biology**, Victoria, v. 44, n. 4, p. 1-4, 2017.

SARKAR, R.K. Seed priming improves agronomic trait performance under flooding and non-flooding conditions in rice with QTL SUB1. **Rice Science**, Hangzhou, v. 19, n. 4, p. 286–294, 2013.

SARTORI, E. M. S. *et al.* Germinação de arroz irrigado e de biótipos de arroz-vermelho submetidas a diferentes temperaturas. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 45, n. 2, p. 319-326, 2014.

SCHMITZ, A. J. *et al.* SUB1A-mediated submergence tolerance response in rice involves differential regulation of the brassinosteroid pathway. **The New Phytologist**, London, v. 198, n. 4, p. 1060–1070, 2013.

TAKAHASHI, H. *et al.* Rice alcohol dehydrogenase 1 promotes survival and has a major impact on carbohydrate metabolism in the embryo and endosperm when seeds are germinated in partially oxygenated water. **Annals of Botany**, Oxford, v. 113, n. 5, p. 851–859, 2014.

TUOMI, J.M. *et al.* Bias in the C_q value observed with hydrolysis probe based quantitative PCR can be corrected with the estimated PCR efficiency value. **Methods**, San Diego, v. 50, n. 4, p. 313–322, 2010.

UMEMURA, T. *et al.* Sugar sensing and α -amylase gene repression in rice embryos. **Planta**, Berlin, v. 204, n. 2, p. 420-428., 1998.

VOESENEK, L.A.C.J.; BAILEY-SERRES, J. *Flood adaptive traits and processes: an overview*. **The New Phytologist**, London, v. 206, n. 1, p. 57–73, 2015.

WANG, B. *et al.* Differential contributions of ammonia oxidizers and nitrite oxidizers to

nitrification in four paddy soils. **The ISME Journal**, Wageningen, v. 9, n. 1, p. 1062–1075, 2015.

XIE, F. *et al.* miRDeepFinder: a miRNA analysis tool for deep sequencing of plant small RNAs. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 80, n. 1, p. 75-84, 2012.

XU, K. *et al.* *Sub1A* is an ethylene response factor-like gene that confers submergence tolerance to rice. **Nature**, New York, v. 442, n. 7103, p. 705–708, 2006.

ZHANG, M. *et al.* Association mapping reveals novel genetic loci contributing to flooding tolerance during germination in Indica rice. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 8, n. 678, 2017.

5 CAPÍTULO III

Caracterização da região promotora de gene *OsXTH8* e cultura de tecido em arroz daninho

CARACTERIZAÇÃO DA REGIÃO PROMOTORA DE GENE *OsXTH8* E CULTURA DE TECIDO EM ARROZ DANINHO

RESUMO

O degrane é um dos principais caracteres de invasibilidade do arroz daninho, que resulta na perpetuação dessa planta daninha em lavouras de arroz. A regulação do degrane é atribuída ao efeito de diferentes genes, entre os quais recentemente também foi associada a *OsXTH8* que codifica enzimas com ação de clivagem de polímeros da parede celular e formação da camada de abscisão. Abordagens moleculares que buscam mitigar caracteres de invasibilidade exigem a utilização de protocolos de cultura de tecido bem estabelecidos, conhecimento este inexistente em arroz daninho. O objetivo deste estudo foi investigar a variabilidade nucleotídica da região promotora do gene *OsXTH8*, bem como determinar protocolo de obtenção de plantas de arroz daninho a partir de cultura de tecido. A região promotora do gene *OsXTH8*, correspondente a um fragmento de 1.1Kb, foi sequenciada a partir do DNA genômico de dez acessos de arroz daninho e quatro cultivares de arroz contrastantes para o caractere do degrane. A avaliação de protocolo de cultura de tecidos foi realizada em duas cultivares de arroz e 11 acessos de arroz daninho provenientes do Rio Grande do Sul e do Arkansas. A inserção de uma base “G” ou “C” foi observada na posição 289bp *upstream* do *start códon* do gene *OsXTH8* e próxima ao *motif* responsivo a giberelina P-Box em todos os genótipos de arroz daninho com elevado degrane. No estudo de cultura de tecidos, o genótipo de arroz daninho AV60 apresentou desempenho similar a cultivar Nipponbare, considerada a padrão para esta técnica, obtendo 15 plantas regeneradas a cada 15 sementes utilizadas, enquanto os genótipos AV53, LIN-08-B07 e IRGA 417 obtiveram 6; 4 e 2 plantas, respectivamente. A ocorrência de inserção na região promotora do gene *OsXTH8* próxima ao *motif* P-Box pode ser correlacionada ao degrane em arroz daninho. O genótipo de arroz daninho AV60 apresenta elevada capacidade de indução de calos e regeneração de plantas, podendo ser usado em estudo que vise o cultivo *in vitro* como uma ferramenta de propagação da planta em áreas biotecnológicas.

CHARACTERIZATION THE PROMOTER REGION OF GENE *OsXTH8* AND TISSUE CULTURE IN WEEDY RICE

ABSTRACT

Seed shattering is one of the main characters of invasiveness of weedy rice, which results in the perpetuation of this weed in rice fields. The regulation of this trait is attributed the effect of different genes, among which recently it was also associated with *OsXTH8* that encodes enzymes with action of cleavage of polymers of the cell wall and formation of the abscission layer. Molecular approaches designed to mitigate invasiveness traits require the use of established tissue culture protocols, a knowledge that does not exist in weedy rice. The objective of this study was to investigate the nucleotide variability of the promoter region of the *OsXTH8* gene and determine the protocol for obtaining weedy rice plants from tissue culture. The promoter region of the *OsXTH8* gene, corresponding to a 1.1Kb fragment, was sequenced from the genomic DNA of ten weedy rice accessions and four rice cultivars contrasting for the seed shattering. The evaluation of tissue culture protocol was performed in two rice cultivars and 11 accesses of weedy rice from Rio Grande do Sul and Arkansas. The insertion of a "G" or "C" nucleotide was observed at position 289bp upstream of the start codon on the *OsXTH8* gene next to the gibberellin P-Box responsive motif in all weedy rice genotypes with high seed shattering. In the tissue culture study, the AV60 weedy rice genotype showed similar performance to Nipponbare cultivar, considered the standard for this technique, obtaining 15 regenerated plants for each 15 seeds used, while genotypes AV53, LIN-08-B07 and IRGA 417 obtained 6; 4 and 2 plants, respectively. The occurrence of insertion into the promoter region of the *OsXTH8* gene next to the P-Box motif can be correlated to shattering seeds in weedy rice. The AV60 weedy rice genotype presents high capacity for callus induction and plant regeneration and can be used in studies which require in vitro cultivation.

5.1 Introdução

O degrane é a principal característica de perpetuação do arroz daninho em áreas cultivadas com arroz, pois impossibilita sua retirada da lavoura no momento da colheita e proporciona o aumento do banco de sementes (Delouche *et al.*, 2007). Seletivamente o processo de domesticação de arroz resultou em plantas com baixo degrane de sementes, em conjunto com outros caracteres como uniformidade de floração, composição de sementes, altura da planta e rendimento de grãos, de modo a proporcionar o cultivo, a colheita manual ou automatizada (Ji *et al.*, 2006; Lawton-Rauh & Burgos 2010). No entanto, o degrane de sementes é um caractere de invasibilidade do arroz daninho que co-evoluiu com o arroz cultivado, tornando essa espécie a mais importante planta daninha da cultura (Thurber *et al.*, 2010; Nunes *et al.*, 2015).

A presença do degrane é comum em todo o arroz daninho, mas apresenta variabilidade quanto ao momento e grau de ruptura entre genótipos (Delouche *et al.*, 2007). O degrane presente em arroz daninho está relacionado a presença de uma camada de abscisão formada por pequenas células com parede celular fina entre o grão de arroz e o pedicelo (Li *et al.*, 2006). A zona de abscisão geralmente compreende uma única camada de células diferenciadas de onde posteriormente inicia-se a degradação da lamela média e paredes celulares que favorecem o processo de ruptura (Patterson, 2001; Roberts, 2002; Ji *et al.*, 2010). Estudos moleculares indicam que o caractere degrane é relacionado à presença de inúmeros genes, entre os quais alguns envolvidos na diferenciação da camada de abscisão ou codificando enzimas que promovem a clivagem da parede celular (Thurber *et al.*, 2010, Nunes *et al.*, 2015).

Estudos independentes relatam a participação de diferentes genes na regulação do caractere degrane em arroz. Os genes *qSH1* e *SH4* são descritos por regular cerca de 70% do degrane para as subespécies Japonesa e indica, respectivamente (Konishi *et al.*, 2006; Li *et*

al., 2006). Entretanto, estudos posteriores indicam a menor importância desses genes sobre o controle do degrane e, ainda demonstram a participação dos genes *OsCPL1* e *SHAT1* no controle desse caractere de invasibilidade (Ji *et al.*, 2010; Zhou *et al.*, 2012). Recentemente, a análise de expressão de seis genes putativos relacionados à síntese/degradação da parede celular revelou a importância dos genes *OsXTH8* e *OsCel9D* sobre o caractere degrane em arroz daninho (Nunes *et al.*, 2014). Neste contexto, a regulação do degrane é função de vários genes, atuando de forma isolada ou associada.

O gene *OsXTH8* codifica a enzima *xyloglucan endotransglycosylase/hydrolase* relacionada à clivagem de polímeros de xiloglucano da parede celular (Jan *et al.*, 2004). A maior atividade dessas enzimas pode estimular a formação da camada de abscisão e promover o degrane. Neste contexto, em avaliação dez dias após a polinização, a maior expressão relativa do gene *OsXTH8* foi detectada em genótipos de arroz daninho com elevado nível de degrane (Nunes *et al.*, 2015). Contudo, ao investigar possíveis alterações na sequência gênica, nenhuma das mutações conhecidas foi associada ao degrane, indicando a possível existência de mutações em regiões não codificadoras ou na região promotora desse gene (Nunes *et al.*, 2015). A presença de alterações na região promotora pode alterar sua expressão e impactar sobre o degrane. A compreensão da presença do gene *OsXTH8* em diferentes genótipos de arroz daninho e sua relação com o degrane poderá ser utilizada em conjunto com o conhecimento do efeito dos demais genes envolvidos com esse caractere para determinar abordagens biotecnológicas e práticas de manejo visando a mitigação dos problemas com esta planta daninha em lavouras de arroz irrigado.

O desenvolvimento de abordagens moleculares visando mitigar caracteres de invasibilidade em plantas daninhas exige, em muitos casos o domínio de técnicas de cultura de tecidos (Ge *et al.*, 2006; Bevitori, 2015). A indução de calos embriogênicos com alta capacidade de regeneração é essencial para intervenções e investigações biotecnológicas (Bevitori *et al.*, 2014). Para arroz cultivado diversos protocolos são conhecidos e utilizados

na obtenção de plantas a partir de calos embriogênicos. Apesar de pertencer a mesma espécie do arroz cultivado, para arroz daninho em função da presença abundante de fenóis e outros elementos do metabolismo secundário, não há protocolo eficiente para essa abordagem.

A ausência de metodologia eficaz na transformação de arroz daninho impossibilita o desenvolvimento de técnicas de mitigação de caracteres de invasibilidade que exijam a transformação gênica intermediada por cultura de tecidos. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi investigar a variabilidade nucleotídica da região promotora do gene *OsXTH8*, bem como determinar protocolo de obtenção de plantas de arroz daninho a partir de cultura de tecido.

5.2 Material e métodos

5.2.1 Sequenciamento da região promotora do gene *OsXTH8*

O estudo foi conduzido no Laboratório de Biotecnologia do Departamento de Lavoura da Faculdade de Agronomia, UFRGS, Porto Alegre, Brasil e no Weedy Physiology Laboratory (WPL) da University of Arkansas Fayetteville, AR, USA. O material vegetal utilizado consistiu em dez acessos de arroz daninho e quatro cultivares de arroz descritas como contrastantes para o degrane conforme Tabela 4 (Nunes *et al.*, 2015).

Plântulas dos genótipos de arroz foram obtidas em ambiente climatizado do LBDPL e o DNA genômico foi extraído a partir de plantas individuais, usando o método CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio) modificado (Doyle and Doyle, 1987). O material vegetal foi macerado na presença de nitrogênio líquido (LN₂) e acondicionado em microtubos de 1,5 mL previamente resfriados. Quinhentos µL de tampão de extração (0,1 M Tris-HCl [pH 8,0], 0,02 M EDTA [pH 8,0], 1,4 M NaCl, 2% CTAB) foram adicionados a cada tubo, seguido por agitação vigorosa. Após os tubos foram incubados a 65 °C por 30 min em banho-maria,

com agitação dos tubos a cada 10 min. Em seguida, 500 μL da mistura clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) foi adicionada a cada tubo, misturada por 5 min e centrifugado a 10.000 rpm por 5 min em temperatura ambiente. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo e 75 μL de RNase (100 mg mL^{-1}) foram adicionados e incubados a 37°C durante 60 min. Em seguida, o DNA foi precipitado com 300 μL de álcool isopropanol gelado, agitado gentilmente e acondicionado por 12 h a 4°C . No dia seguinte, após 10 min em temperatura ambiente foi realizada centrifugação por 30 min a 14.000 rpm e, o sobrenadante descartado. O precipitado foi lavado com etanol 70%, centrifugado por 5 min a 10.000 rpm e na sequência o etanol foi descartado, o precipitado secado por 20 a 30 min e ressuspensionado em 30 μL de TE 0,1X (pH=8). O DNA foi quantificado utilizando-se espectrofotômetro Genesys 2® (Thermo Spectronic) e diluído a $20 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$.

Os primers foram desenhados no WPL com auxílio do programa computacional Primer3Plus (Untergasser *et al.*, 2007). A partir da sequência nucleotídica obtida do genebank (NP_001061319.1) foi selecionado um fragmento 1.1 kb *upstream* do *start códon* para a confecção dos primers, correspondente a região promotora do gene. A sequência do primer *forward* obtido foi *OsXTH8_F1* (5'- TCCCCTACTTG TGTCCAAGG-3') e o *reverse* *OsXTH8_R1* (5'-CACCACGTCGAACTTCTCG -3'), sendo 60°C a temperatura ótima de pareamento.

A reação de cadeia de polimerase (PCR) foi realizada com 25 μL do mix de reação, composto por 4 μL de DNA, 0.4 μM de primer forward e primer reverse, 12.5 μL de Taq2x master mix (New England Biolabs Inc., Ipswich, MA, USA), e água livre de nuclease. A reação foi realizada em termo ciclador (PTC-200, MJ Research, Inc., Watertown, MA, USA), utilizando o protocolo que consistiu de 3 min de incubação a 94°C , seguido de 40 ciclos de 94°C por 1 min para desnaturação da fita de DNA; 60°C por 1 min, para o pareamento dos primers; 72°C por 1,5 min para extensão da fita de DNA e um ciclo de extensão final de 72°C por 10 min.

TABELA 1. Identificação dos acessos de arroz daninho e cultivares de arroz, espécies e subespécies e origem dos genótipos utilizados no sequenciamento da região promotora do gene *OsXTH8*. University of Arkansas, Fayetteville, USA, 2017.

Genótipo	Tipo	Specie/Subspecie	Degrane	Origem
AV53	Daninho	<i>Oryza sativa</i>	*E	**RS/Brasil
AV60	Daninho	<i>Oryza sativa</i>	E	RS/Brasil
AV133	Daninho	<i>Oryza sativa</i>	E	RS/Brasil
EEI 23	Cultivado	<i>Oryza sativa sub. Indica</i>	B	SC/Brasil
IRGA417	Cultivado	<i>Oryza sativa sub. Indica</i>	M	RS/Brasil
AV182	Daninho	<i>Oryza sativa</i>	M	RS/Brasil
AV31	Daninho	<i>Oryza sativa</i>	M	RS/Brasil
NIPPONBARE	Cultivado	<i>Oryza sativa sub. Japonica</i>	B	SC/Brasil
EMPASC	Cultivado	<i>Oryza sativa sub. Indica</i>	B	SC/Brasil
ITJ11	Daninho	<i>Oryza sativa</i>	H	SC/Brasil
AV109	Daninho	<i>Oryza sativa</i>	H	RS/Brasil
AV172	Daninho	<i>Oryza sativa</i>	H	RS/Brasil
AV04	Daninho	<i>Oryza sativa</i>	H	RS/Brasil
AV189	Daninho	<i>Oryza sativa</i>	L	RS/Brasil

*E= Elevado degrane M=Médio degrane; B=Baixo degrane **SC e RS refere-se aos estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul, respectivamente.

Os produtos amplificados foram analisados em gel de agarose a 0,8%, e purificados usando Wizard SV Gel e PCR Clean-Up System (Promega). Na sequência as amostras foram encaminhadas para o sequenciamento pela empresa Eurofins Genomics. Os resultados do sequenciamento foram analisados e alinhados usando a sequência do gene *OsXTH8* da cultivar de arroz Nipponbare disponível no GenBank. O alinhamento das sequências foi realizado com o software Sequencher v.5 e a identificação dos polimorfismos com o software Bioedit v.7. A identificação dos motifs foi realizada com auxílio do software *Plant Cis-Acting Regulatory Elements* (PlantCare), que possui banco de dados específico de plantas e contém referências comprovadas experimentalmente da atuação desses elementos de regulação no controle da expressão gênica (Lescot *et al.*, 2002).

5.2.2 Cultura de tecido em arroz daninho

O trabalho foi desenvolvido no Tissue Culture Laboratory da da University of Arkansas Fayetteville, AR, USA. Sementes de 13 genótipos de arroz cultivado e arroz daninho provenientes do Rio Grande do Sul - Brasil e do Arkansas - EUA foram submetidas ao protocolo de indução de calos e regeneração de plantas (Tabela 2). A lema e pálea das sementes maduras dos diferentes genótipos foram removidas mecanicamente e na sequência foi procedida a assepsia por imersão em etanol 75% por 30 segundos e solução de hipoclorito de 30% por 30 minutos sob agitação vigorosa.

TABELA 2. Identificação dos acessos de arroz daninho e cultivares de arroz, espécies e subespécies e origem dos genótipos utilizados na cultura de tecidos. University of Arkansas, Fayetteville, USA, 2017.

Genótipo	Tipo	Specie/Subspecie	Origem
ARK 08-C03	Daninho	<i>Oryza sativa</i>	AR*/United States
LON-08 D1	Daninho	<i>Oryza sativa</i>	AR/United States
RR641	Daninho	<i>Oryza sativa</i>	AR/United States
RR642	Daninho	<i>Oryza sativa</i>	AR/United States
RR440	Daninho	<i>Oryza sativa</i>	AR/United States
RR474	Daninho	<i>Oryza sativa</i>	AR/United States
RR 22	Daninho	<i>Oryza sativa</i>	AR/United States
RR 851	Daninho	<i>Oryza sativa</i>	AR/United States
NIPPONBARE	Cultivado	<i>Oryza sativa sub. Japonica</i>	AR/United States
AV53	Daninho	<i>Oryza sativa</i>	RS/Brasil
IRGA 417	Cultivado	<i>Oryza sativa sub. Indica</i>	RS/Brasil
AV 60	Daninho	<i>Oryza sativa</i>	RS/Brasil
LIN 08- B07	Daninho	<i>Oryza sativa</i>	AR/United States

*AR and RS refere-se aos estados do Arkansas e Rio Grande do Sul, respectivamente.

Após a assepsia, as sementes foram lavadas cinco vezes com água destilada e secas sobre papel esterilizado no interior de câmara de fluxo. Placas de petri foram utilizadas para acomodar o meio de cultura de indução de calos 2N6D (Nishimura *et al.*, 2006; Tabela 3),

onde foram dispostas 15 sementes por placa, com 3 repetições por genótipo. As placas foram incubadas a 29,5 °C sob luz contínua por duas semanas. Calos saudáveis em formação foram transferidos para novo meio de indução 2N6D e mantidos para proliferação nas mesmas condições descritas anteriormente.

TABELA 3. Meios de cultura de tecidos: Indução de calos (2N6D); Regeneração; Indução de raízes (MS/2) e Vitamina (N6 Vitamina). University of Arkansas, Fayetteville, USA, 2017.

Componentes (L⁻¹)	2N6D	Regeneração	MS/2	N6 Vitamina
N6 basal salt mixture (g)	3,98	4,6	4,6	-
Myo-inositol (g)	0,01	0,01	0,01	-
Casaminoacids (g)	0,30	2	-	-
L-Proline (g)	2,90	-	-	-
2.4-D (10mg/ml) (µl)	100,00	-	-	-
Sucrose (g)	30,00	30,00	30,00	-
N6 Vitamin (100x) (ml)	5,00	-	-	-
Phytogel (g)	3,00	3,00	3,00	-
MS Vitamin (100x) (ml)	-	10,00	10,00	-
Sorbitol (g)	-	30,00	-	-
BAP (1mg/ml)	-	3,00	-	-
NAA (1mg/ml)	-	0,10	-	-
ABA (5 mg/ml)	-	1,00	-	-
Ph	5,8	5,8	5,8	-
Glycine (g)	-	-	-	0,2
Nicotine Acid (g)	-	-	-	0,05
Piridoxine Hydrochloride (g)	-	-	-	0,05
Thiamine Hydrochloride (g)	-	-	-	0,10

Após duas semanas de crescimento, calos com boa formação e coloração adequada (não escurecidos e necrosados) foram transferidos para o meio de regeneração, para indução de parte aérea, permanecendo neste por uma semana em condição de 25 °C e sob 23h de luz e 1h de escuro. Calos com formação de parte aérea foram transferidos para o meio MS/2 para a indução de raízes, mantendo-se as mesmas condições de temperatura e luminosidade. Após duas semanas, plantas regeneradas foram transferidas para substrato comercial e mantidas em casa de vegetação com ambiente controlado. Foram avaliados o

número de calos obtidos (28 dias após a indução), e estatura e sobrevivência de plantas 14 dias após o transplante em substrato. Os dados foram submetidos à análise de variância e verificada a significância foram submetidos à comparação de médias pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

5.3 Resultados e discussão

5.3.1 Sequenciamento da região promotora do gene *OsXTH8*

O sequenciamento da região promotora do gene *OsXTH8* de diferentes genótipos de arroz cultivado e arroz daninho com diferentes níveis de degrane revelou a presença de uma inserção de base na posição 289bp upstream do *start códon* (Figura 1). A inserção só foi observada nos genótipos de arroz daninho com alto degrane (Nunes *et al.*, 2015). O genótipo AV 133 apresentou a inserção da base C e os genótipos AV04, ITJ11, AV109, AV172, AV53 e AV60 possuem base G nesse local, sendo que todos são arroz daninho de elevado degrane. Essa inserção está posicionada 9bp *upstream* do *motif* responsivo ao hormônio giberelina Prolamin -Box (CCTTTTG).

A alteração encontrada próxima ao *motif* P-Box pode estar associada ao degrane em arroz daninho. *Motifs* ou motivos são padrões curtos e recorrentes de sequências de DNA que se supõe ter uma função biológica (D'haeseleer, 2006). Em muitos casos os *motifs* indicam especificidade de sites de ligação para proteínas como nucleases e fatores de transcrição, assim como estão envolvidos em processos importantes em nível de RNA, incluindo a ligação aos ribossomos, processamento de mRNA e terminação da transcrição, influenciando diretamente na expressão do gene em que ocorrem (Andersen & Bberstedt, 2003; D'haeseleer, 2006). Alguns *motifs* P-Box são identificados na região promotora de gene do endosperma de sementes em cevada, milho e arroz além da parte aérea do arroz,

atrelados a fatores de transcrição responsivo a giberelina e etileno, sendo posicionados entre -270 e -310 bp *upstream* do *start códon* (Mena *et al.*, 2002; Reyes, *et al.*, 2015; Du *et al.*, 2017).

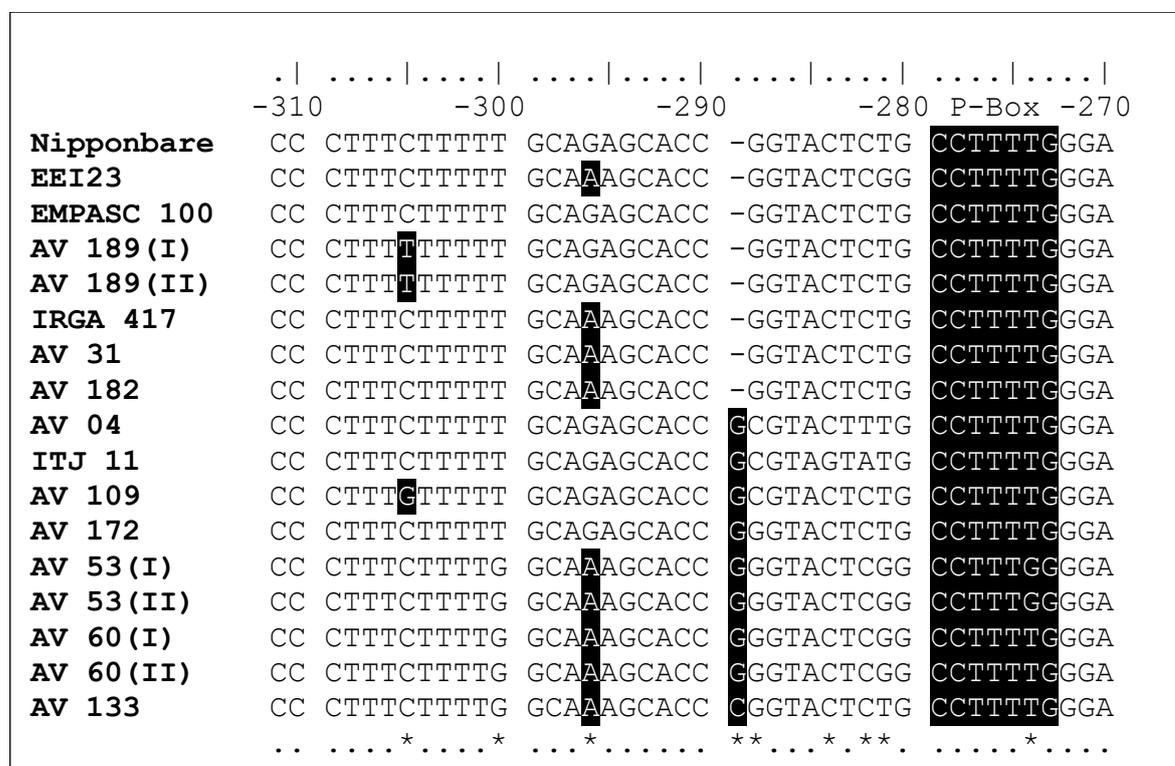


FIGURA 1. Alinhamento parcial da sequência referente a região promotora (1.1 kb) do gene *OsXTH8* em 10 genótipos de arroz daninho e quatro cultivares de arroz (Fita senso). University of Arkansas, Fayetteville, USA, 2017.

O gene *OsXTH8* ao codifica a enzima *xyloglucan endotransglycosylase/ hydrolase* que estimula a clivagem de β -1-4-xiloglucanos da parede celular primária, desempenhando função importante na construção e reestruturação de ligações cruzadas de xiloglucano (Jan *et al.*, 2004). Esse gene foi caracterizado como responsivo à giberelina, apresentando incremento na sua atividade na presença desse hormônio (Jan *et al.*, 2004). Deste modo, a expressão do gene *OsXTH8* em genótipos de arroz daninho, sinalizada por giberelina, pode ser intermediada pelos *motif P-Box*. A inserção de uma base próximo ao *motif P-Box* pode interferir na percepção e na resposta a este hormônio, resultando em maior expressão do gene *OsXTH8*, corroborando com o elevado degrane observado para os genótipos de arroz daninho (Nunes *et al.*, 2015). A confirmação da resposta diferencial deste gene a giberelina,

através da utilização de RNA de interferência ou inibidores desse hormônio podem elucidar o efeito do mesmo sobre o degrane e ainda se tornar uma ferramenta de mitigação para essa característica de invasibilidade do arroz daninho.

5.3.2 Cultura de tecido em arroz daninho

Os genótipos de arroz utilizados obtiveram diferencial desempenho quando submetidos a cultura de tecido (Tabela 4, Figura 2). O melhor desempenho na produção de calos foi observado para a cultivar Nippombare com a produção de cerca de 128 calos viáveis por placa (Figura 2), enquanto que os genótipos de arroz daninho ARK08-C03, LON-08D1, RR 641, RR440, RR 474, RR22 e RR 851, todos provenientes do Arkansas-EUA, não produziram calos viáveis. O maior número de calos observado para a cultivar Nipponbare corrobora o estudo de cultura de tecido em acessos de arroz provenientes da Indonésia, que consideram esse genótipo o modelo para trabalhos de transformação, com eficiência de obtenção de calos superior a 80% (Carsono & Yoshida, 2006).

A cultivar de arroz brasileira IRGA 417 demonstrou menor capacidade de produção de calos quando comparada a Nipponbare, com apenas 31 calos induzidos a cada 15 sementes maduras utilizadas. Entre os acessos de arroz daninho, o melhor desempenho foi apresentado pelos genótipos provenientes do Brasil, AV 53 e AV 60 com 85 e 65 calos obtidos por placa, respectivamente. Contudo, apenas o genótipo de arroz daninho AV60 demonstrou elevada capacidade de regeneração da parte aérea e indução de raízes (Figura 2 C e F). O genótipo LIN 08- B07 foi o único acesso de arroz daninho com origem no Arkansas capaz de desenvolver calos com o protocolo testado, com 40 calos obtidos por placa (Tabela 4). Contudo, é importante ressaltar que a obtenção de calos é genótipo-específica e alterações na composição do meio de indução e regeneração geram respostas diferentes (Hoque *et al.*, 2007; Bevitori, 2015).

TABELA 4. Número de calos obtidos, plantas regeneradas e altura de plantas de diferentes genótipos de arroz submetidos a cultura de tecido. University of Arkansas, Fayetteville, USA, 2017.

Genótipo	N de Calos	N de plantas Regeneradas	Estatura de planta (cm)
ARK 08-C03	*0,00 E	0,00 C	0,00 C
LON-08 D1	0,00 E	0,00 C	0,00 C
RR641	0,00 E	0,00 C	0,00 C
RR642	0,00 E	0,00 C	0,00 C
RR440	0,00 E	0,00 C	0,00 C
RR474	0,00 E	0,00 C	0,00 C
RR 22	0,00 E	0,00 C	0,00 C
RR 851	0,00 E	0,00 C	0,00 C
NIPPONBARE	128,33 A	16,00 A	54,8 A
AV53	85,33 B	6,33 B	41,7 B
IRGA 417	31,67 D	2,00 BC	39,3 B
AV 60	65,33 C	15,83 A	44,5 B
LIN 08- B07	40,33 D	4,67 B	57,4 A
CV (%)	20,45	13,21	12,38

*Médias antecedidas por letras maiúsculas idênticas, não diferem entre si para diferentes genótipos de arroz, tukey ($p \leq 0,05$).

A obtenção de calos embriogênicos é dependente da utilização de sementes vigorosas, livres de contaminações endógenas e sem dormência. Nesse sentido, os genótipos que não responderam a cultura de tecido no presente trabalho apresentaram germinação acima de 80% e ausência de contaminação (dados não apresentados). Deste modo, infere-se que a resposta diferencial obtida em relação a cultura de tecidos é resultante apenas da variabilidade genética entre os genótipos de arroz. Além disso, a qualidade dos calos embriogênicos pode ser melhorada pela otimização das quantidades dos componentes no meio de indução, como a concentração de fitormônios, dentre outros, favorecendo assim o desenvolvimento de potenciais morfogenéticos de cada genótipo (Bevitori *et al.*, 2014). A suplementação do meio de indução de calos com asparagina, arginina e maltose (em substituição à sacarose) elevou de 75 para 95% a capacidade de obtenção de calos em cultivares de arroz (Bevitori, 2015).

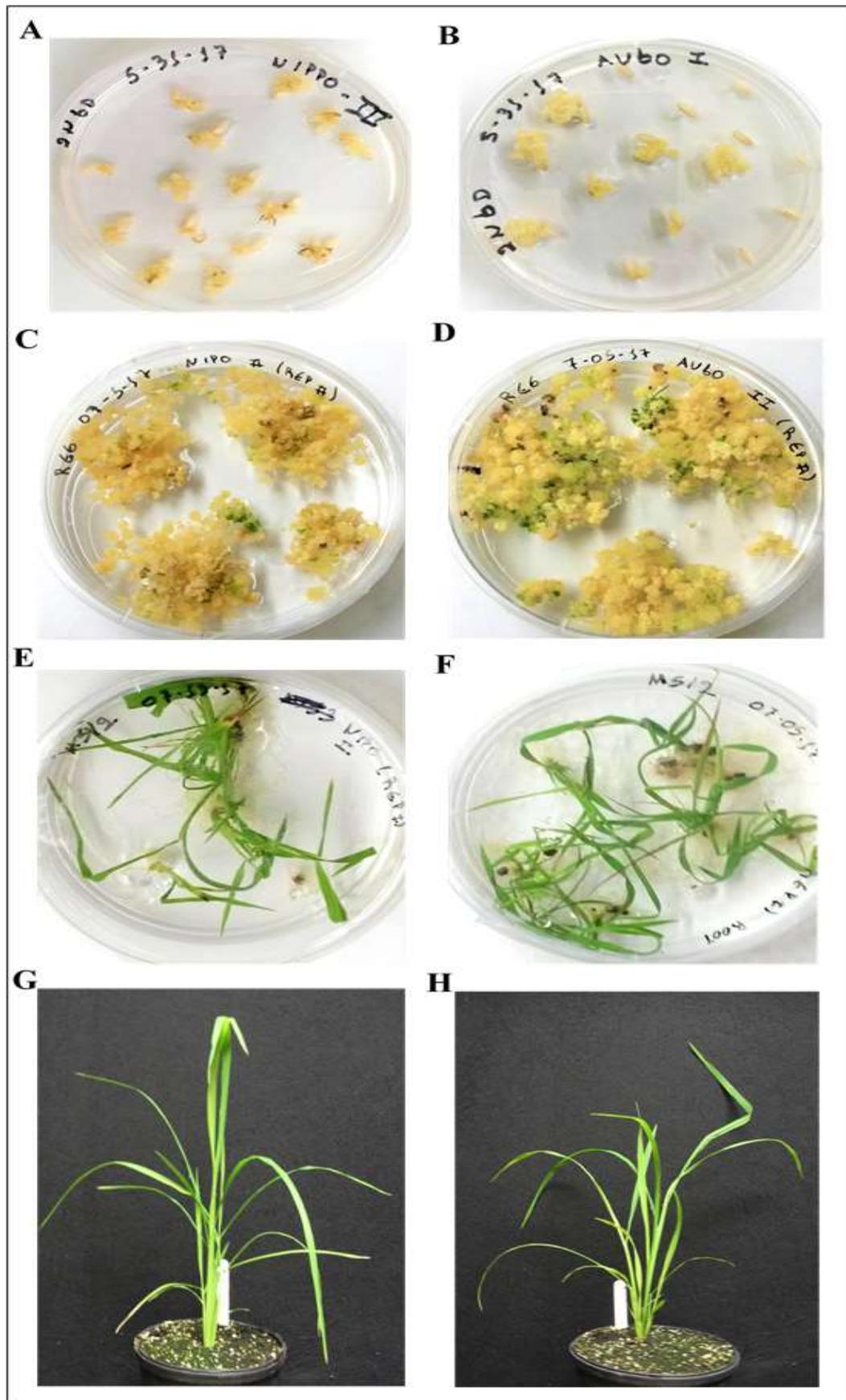


FIGURA 2. Indução de calos embriogênicos, regeneração de parte aérea, indução de raízes e plantas regeneradas duas semanas após o transplante para os genótipos Nipponbare (A, C, E e G) e AV60 (B, D, F e H). University of Arkansas, Fayetteville, USA, 2017.

A sobrevivência de plantas, avaliada duas semanas após o transplante em substrato, demonstrou baixa capacidade de regeneração a partir de calos embriogênicos dos genótipos AV53, IIRGA 417 e LIN 08-B07 que apresentaram 6; 2 e 5 plantas obtidas por placa, respectivamente (Tabela 4). Enquanto que o arroz daninho AV60 não diferenciou da cultivar Nippombare para o número de plantas obtidas, com cerca de 16 plantas por placa para ambos os genótipos (Figura 2). A diferença de estatura observada entre os genótipos duas semanas após o transplante indica a melhor adaptação dos genótipos Nipponbare e LIN 08-B07, com 54,8 e 57,4 cm. Entretanto, a diferença de estatura pode ser resultado da variação genética dos genótipos e não necessariamente do efeito da cultura de tecidos. Entretanto, a obtenção de calos *per se* não garante o sucesso da cultura de tecido, mas a regeneração de plantas com capacidade de sobreviver em condições de casa de vegetação é fundamental na escolha do genótipo a ser utilizado nessa técnica (Bevitori, 2015). Deste modo, o genótipo de arroz daninho AV60 demonstrou ser o mais adequado para utilização em estudos de cultura de tecido e transformação genica.

5.4 Conclusões

A participação do gene OsXTH8 na característica do degrane de sementes em arroz vermelho foi confirmada. A ocorrência de uma inserção na região promotora deste gene na posição 289bp *upstream* do *start códon* e próxima ao *motif P-Box* está associada com a elevada taxa de degrane em arroz daninho. Este gene pode atuar em conjunto com outros genes já conhecidos na complexa regulação da intensidade do degrane de sementes em arroz daninho.

Existem diferenças em relação a viabilidade de propagação em cultura de tecidos entre genótipos de arroz daninho. O genótipo de arroz daninho AV60 apresenta elevada

capacidade de indução de calos e regeneração de plantas, podendo ser usado em estudo que visem o cultivo *in vitro* como uma ferramenta de propagação da planta em áreas biotecnológicas.

5.5 Referências

ANDERSEN, J.R.; LÜBBERSTEDT, T. Functional markers in plants. *Trends Plant Science*, Oxford, v. 8, n. 11, p. 554-560, 2003.

BEVITORI, R. *et al.* Morpho-anatomical characterization of mature embryo-derived callus of rice (*Oryza sativa* L.) suitable for transformation. *Protoplasma*, Leipzig, v. 251, n. 3, p. 545-554, 2014.

BIVETORI, R. **Avaliação de Cultivares de Arroz (*Oryza sativa* L.) para Cultivo In Vitro**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa, 2015. (Comunicado Técnico, 224).

CARSONO, N.; YOSHIDA, T. Identification of callus induction potential of 15 Indonesian rice genotypes. *Plant Production Science*, Kyoto, v. 9, n. 1, p. 65–70, 2006.

DELOUCHE, J.C. *et al.* **Weedy rices-origin, biology, ecology, and control**. Rome: FAO, 2007. 144 p.

D'HAESELEER, P. What are DNA sequence motifs? *Nature biotechnology*, New York, v. 24, n. 4, p. 423-425, 2006.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, Oxford, v. 19, n. 3, p. 11–15, 1987.

DU, L. *et al.* Gene cloning of ZmMYB59 transcription factor in maize and its expression during seed germination in response to deep sowing and exogenous hormones. *Plant Breeding*, London, v. 136, n. 6, p. 834–844, 2017.

GE, X. *et al.* A tissue culture system for different germplasms of indica rice. *Plant Cell Reports*, Berlin, v. 25, n. 5, p. 392-402, 2006.

HOQUE, M.N.; RAHMAN, L.; HASSAN, L. Effect of culture media on seed dormancy and callus induction ability of some wild and cultivated rice genotypes. *Biotechnology*, Stoneham, v. 6, n. 1, p. 61-63, 2007.

JAN, A. *et al.* Characterization of a xyloglucan endotransglucosylase gene that is up-regulated by gibberellin in rice. *Plant Physiology*, Rockville, v. 136, n. 3, p. 3670–3681, 2004.

JI, H. *et al.* Inactivation of the CTD phosphatase-like gene OsCPL1 enhances the development of the abscission layer and seed shattering in rice. *Plant Journal*, Oxford, v. 61, n. 1, p. 96–106, 2010.

JI, H.S. *et al.* Characterization and mapping of a shattering mutant in rice that corresponds to a block of domestication genes. **Genetics**, Austin, v. 173, n. 2, p. 995–1005, 2006.

KONISHI, S. *et al.* An SNP caused loss of seed shattering during rice domestication. **Science**, Washington, v. 312, n. 5778, p. 1392–1396, 2006.

LAWTON-RAUH, A.; BURGOS, N. Cultivated and weedy rice interactions and the domestication process. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 19, n. 16, p. 3243–3245, 2010.

LESCOT, M. *et al.* PlantCARE, a database of plant *cis*-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences. **Nucleic Acids Research**, London, v. 30, n. 1, p. 325–327, 2002.

LI, C. B. *et al.* Rice domestication by reducing shattering. **Science**, Washington, v. 311, n. 5769, p. 1936–1939, 2006.

MENA, M. *et al.* A role for the DOF transcription factor BPBF in the regulation of gibberellin-responsive genes in barley aleurone. **Plant Physiology**, Rockville, v. 130, n. 1, p. 111–119, 2002.

NISHIMURA, A.; AICHI, I.; MATSUOKA, M. A protocol for *Agrobacterium* mediated transformation in rice. **Nature Protocols**, London, v. 1, n. 6, p. 2796–2802, 2006.

NUNES, A. L. *et al.* Nucleotide variability and gene expression reveal new putative genes related to seed shattering in weedy rice. **Annals of Applied Biology**, Warwickshire, v. 166, n. 1, p. 39–52, 2015.

NUNES, A.L.; DELATORRE, C.A.; MEROTTO, A. Gene expression related to seed shattering and the cell wall in cultivated and weedy rice. **Plant Biology**, Stuttgart, v. 16, n. 5, p. 888–96, 2014.

PATTERSON, S.E. Cutting loose. Abscission and dehiscence in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 126, n. 2, p. 494–500, 2001.

REYES, L.B.G. *et al.* Upstream regulatory architecture of rice genes: summarizing the baseline towards genus-wide comparative analysis of regulatory networks and allele mining. **Rice**, New York, v. 8, n. 14, p. 1–21, 2015.

ROBERTS, J.A. *et al.* Abscission, dehiscence, and other cell separation processes. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 53, n. 3, p. 131–158, 2002.

THURBER, C.S. *et al.* Molecular evolution of shattering loci in US weedy rice. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 19, n. 16, p. 3271–3284, 2010.

UNTERGASSER, A. *et al.* Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. **Nucleic Acids Research**, London, v. 35, p. 71–74, 2007.

6 CONCLUSÕES GERAIS

A utilização de lâminas de água de cinco e 10 cm é capaz de discriminar genótipos de arroz daninho de média e elevada tolerância à submersão durante a germinação e o crescimento inicial, sendo identificado a partir de seleção, 13 e um genótipo com essa capacidade, respectivamente. O genótipo ITJ03 apresentou índices de emergência superior a 90% em condição submersão nas temperaturas de 25 e 30 °C, enquanto para a temperatura de 20 °C ou em profundidades de semeadura superior a 2 cm sob 10 cm de água a emergência não ocorreu. Deste modo, os fatores avaliados mostraram efeito cumulativo sobre a capacidade de germinação e o crescimento inicial do arroz daninho tolerante ao alagamento e poderão compor estratégias de manejo para essa importante espécie daninha da cultura do arroz.

A investigação da expressão relativa de genes responsivos a submersão nas fases iniciais de estabelecimento do arroz daninho indicou que o genótipo tolerante ITJ03 apresentou elevada indução dos genes *RAmy3D*, *OsTPP7*, *ADH1* e *ADH2* relacionados à mobilização de reservas e manutenção da respiração anaeróbica, respectivamente. A estratégia de escape do alagamento, mediada pela expressão diferencial do gene *SNRKL1*, também foi demonstrada pelo genótipo ITJ03 durante a fase de crescimento inicial. Esses mecanismos de tolerância também são relatados em cultivares de arroz originários da Ásia, mas não haviam sido observados em arroz daninho. A participação dos genes *PDC1* e *SUB1*, também identificados em cultivares de arroz tolerante à submersão, apresentaram pouca e

nenhuma resposta ao alagamento em arroz daninho nas condições avaliadas. Em condição de baixa temperatura a expressão dos genes *RAmy3D*, *ADH2* e *SNRK1* foi reduzida na parte aérea e radicular dos genótipos de arroz daninho, enquanto que nas temperaturas de 25 e 30 °C as suas expressões foram estimuladas, especialmente em condição de submersão. A condição de baixa temperatura acentuou o efeito da presença da lâmina de água sobre a capacidade de estabelecimento do arroz daninho, confirmando o observado durante a emergência na mesma condição de temperatura e sob submersão.

Os genótipos de arroz daninho com elevado degrane apresentaram uma inserção na região promotora do gene *OsXTh8*, na posição 289bp *upstream* do *start códon* e próxima ao *motif P-Box*, que pode explicar a associação desse gene com o caractere degrane em arroz daninho. Os genótipos de arroz daninho apresentaram resposta diferenciada quanto a viabilidade de propagação em cultura de tecidos, sendo o genótipo AV60 o que demonstrou elevada capacidade de indução de calos e regeneração de plantas, podendo ser utilizado em estudo que visem o cultivo *in vitro* como uma ferramenta de propagação da planta em áreas biotecnológicas.